



Marlene da Silva Fernandes

Licenciatura em Química

Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no Laboratório da SGS Portugal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Dr^a. Sandra Lampreia Silva, Responsável Técnico,
SGS Portugal

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Professora Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves, FCT/UNL

Vogais: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Maio, 2016

Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no
Laboratório da SGS Portugal

Marlene Fernandes





Marlene da Silva Fernandes

Licenciatura em Química

Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no Laboratório da SGS Portugal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Dra. Sandra Lampreia Silva, Responsável
Técnico, SGS Portugal

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Professora Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves, FCT/UNL

Vogais: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Maio, 2016

**Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no
Laboratório da SGS Portugal**

Marlene da Silva Fernandes
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Universidade Nova de Lisboa

Copyright ©

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Gostaria de manifestar o meu sincero agradecimento àqueles que, de uma forma direta ou indireta, cooperaram na realização deste trabalho, disponibilizando meios materiais, sabedoria e encorajamento:

À Sociedade Geral de Superintendência, S.A. (SGS), na pessoa da Eng.^a Ana Machado, pelo privilégio de ingressar numa empresa de elevado prestígio assim como pela disponibilização das condições essenciais para a realização da presente dissertação.

À Professora Ana Lúcia Leitão, por ter aceitado ser minha orientadora, pelos conselhos, força, apoio incondicional e dedicação, assim como pela disponibilidade e sabedoria transmitida ao longo deste trabalho e do percurso académico.

À Eng.^a Sandra Silva, responsável técnica pelo Laboratório de Química da SGS Portugal, pelo apoio, simpatia e incentivo demonstrados e ainda pela partilha de conhecimentos que disponibilizou durante a realização do estágio.

À toda a equipa do laboratório de química pela amabilidade, e que de certo modo contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial à analista Ana Rita Boleto, pela ajuda, explicação, boa disposição e dedicação, pois sem ela nada disto seria possível.

A todos os meus amigos pelo companheirismo e carinho.

Finalmente, mas não menos importante, á minha família, em especial ao meu namorado, à minha mãe e ao meu irmão, pelo apoio, força e incentivo que me transmitiram ao longo da realização deste trabalho e por me acompanharem nas várias etapas da minha vida.

Um sincero Obrigado a todos.

Resumo

A ocratoxina A é considerada uma das micotoxinas mais tóxicas para a saúde, uma vez que entra na cadeia alimentar do Homem, por esta sobreviver à maior parte dos processamentos a que os alimentos são submetidos. A IARC classifica-a como provável agente carcinogénico para os humanos. É de extrema importância o controlo dos seus níveis nos alimentos, assim como a existência de planos de monitorização dos níveis de contaminação, de modo a serem tomadas medidas para reduzir o risco de contaminação e diminuir o risco da sua ingestão. Sendo que uns dos alimentos mais consumidos diariamente, em todo o mundo, e dos mais afetados pela contaminação desta toxina são o café e os cereais e os seus derivados. Assim de forma a monitorizar os níveis de contaminação de ocratoxina A nesses géneros alimentícios, o presente trabalho teve como objetivo a validação de uma metodologia analítica para a sua quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), no laboratório de Química da SGS Portugal. De forma a garantir fiabilidade dos resultados analíticos obtidos foram avaliados parâmetros como a linearidade, os limites de deteção e quantificação, a repetibilidade, a precisão intermédia e a exatidão. Os resultados mostram que o método é linear para uma gama de trabalho entre 0,500 e 10,0 ng/mL de ocratoxina A. O método permite detetar o analito a partir de 0,266 ng/mL e quantificá-lo entre 0,500 e 10,0 ng/mL. O método de HPLC apresentou repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis, uma vez que os respetivos coeficientes de variação foram inferiores a 5 %. A exatidão do método foi aferida recorrendo a ensaios de recuperação, tendo-se obtido percentagens de recuperação entre 50 - 120 %. Uma vez que estes parâmetros se apresentaram de acordo com os critérios estabelecidos para a validação de um método analítico, o objetivo proposto foi cumprido.

Palavras-chave: Ocratoxina A, HPLC, Quantificação, Validação, Cereais, Café torrado

Abstract

Ochratoxin A is considered one of the most toxic mycotoxins to health, since it enters the human food chain, and because it survives to most types of food processing. The IARC classifies it as probable carcinogenic for humans. It is extremely important to control its levels in food, as well as the existence of plans for monitoring contamination levels, in order to implement measures to reduce the risk of contamination and ingestion. The most affected foods around the world by the contamination of this toxin are coffee and cereals and their derivatives. So in order to monitor the ochratoxin A contamination levels in these foodstuffs, the present study aimed to validate an analytical methodology for their quantification by high-performance liquid chromatography (HPLC), on the Chemistry laboratory of SGS Portugal. To ensure reliability of analytical results parameters such as linearity, detection limits and quantitation, repeatability, intermediate precision and accuracy were evaluated. The results show that the method is linear for a range of concentrations between 0.500 and 10.0 ng/ml of ochratoxin A. The method allows analyte detection from 0.266 ng/mL and it quantifies between 0.500 and 10.0 ng/mL. The HPLC method had acceptable intermediate precision and repeatability, since the respective coefficients of variation were less than 5 %. The accuracy of the method was checked using recovery experiments, being the yielding recovery percentages between 50 - 120 %. Once these parameters were in accordance with the criteria for the validation of an analytical method, the proposed objective was achieved.

Keywords: Ochratoxin A, HPLC, Quantification, Validation, Cereals, Roasted coffee

Índice de matérias

1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Estrutura	2
2. Caracterização da empresa	3
2.1 SGS – Société Générale de Surveillance, S.A	3
2.1.1 Enquadramento histórico	3
2.1.2 Organização administrativa.....	5
2.1.3 Competências/Setores de Atividade	6
3. Micotoxinas.....	9
3.1 Ocratoxina A.....	10
3.1.1 Principais Alimentos contaminados por ocratoxina A	14
3.1.1.1 Cereais	14
3.1.1.2 Café	15
3.1.2 Legislação	16
4. Métodos para determinação de ocratoxina A	21
4.1 Colunas de imunoafinidade.....	22
4.2 Métodos cromatográficos	24
4.3 Métodos imunológicos.....	25
5. Cromatografia líquida de alta eficiência	27
5.1 História	27
5.2 Conceitos básicos	27
5.3 Aplicação	29
5.4 O Sistema de HPLC	29
5.4.1 Injetor.....	30
5.4.2 Bomba	30
5.4.3 Coluna cromatográfica	31
5.4.4 Detetores	33
5.4.5 Processador de dados	35
5.5 Mecanismo de separação cromatográfica	36
5.6 Possíveis problemas e limitações	37

6. Validação de métodos analíticos	39
6.1. Curva de Calibração.....	39
6.1.1 Gama de trabalho.....	40
6.1.2 Linearidade.....	41
6.2 Limiares analíticos.....	42
6.2.1 Limite de deteção	42
6.2.2 Limite de quantificação.....	43
6.3 Sensibilidade	43
6.4 Precisão.....	43
6.4.1 Repetibilidade.....	43
6.4.2 Precisão intermédia.....	44
6.5 Exatidão.....	44
7. Metodologia Experimental.....	47
7.1 Amostras	47
7.2 Reagentes e preparação de soluções	47
7.3 Métodos a validar	48
7.3.1 Cereais	48
7.3.2 Café	49
7.3.3 Condições da cromatografia líquida de alta eficiência.....	50
7.3.4 Quantificação de ocratoxina A por HPLC	50
8. Resultados e Discussão da validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC	53
8.1 Curva de Calibração.....	53
8.1.1 Gama de trabalho.....	53
8.1.2 Linearidade.....	56
8.2 Limiares analíticos.....	57
8.2.1 Limite de deteção	57
8.2.2 Limite de quantificação.....	57
8.3 Precisão.....	58
8.3.1 Repetibilidade.....	58
8.3.2 Precisão intermédia.....	59
8.4 Exatidão.....	61

9. Conclusão.....	65
10. Referências Bibliográficas.....	67

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Logótipos do Grupo SGS	3
Figura 3.1 - Diagrama representativo das fases de produção de alimentos até consumo humano	9
Figura 3.2 – Exemplo de um fungo do género	11
Figura 3.3 – Exemplo de um fungo do género <i>Penicillium</i>	11
Figura 3.4 – Estrutura química da ocratoxina A	13
Figura 3.5 – Fruto do cafeeiro constituído por dois grãos	15
Figura 4.1 – Funcionamento das colunas de imunoafinidade	23
Figura 5.1 – Exemplo de um cromatograma.....	28
Figura 5.2 – Exemplo dos principais componentes de HPLC.....	30
Figura 5.3 – Propriedades físico-químicas da amostra.....	32
Figura 5.4 – Processo de receção do sinal do detetor	35
Figura 7.1 – Exemplo da montagem para realização da passagem de ar pela coluna e do <i>backflushing</i>	49
Figura 8.1 – Curva de Calibração da ocratoxina A na gama de concentrações de 0,500 a 10,0 ng/mL	53
Figura 8.2 – Cromatograma correspondente ao padrão 0,500 ng/m.....	54
Figura 8.3 – Cromatograma correspondente ao padrão 10,0 ng/mL.....	54
Figura 8.4 – Teste de RIKILT para avaliar linearidade.....	57
Figura 8.5 – Cromatograma da amostra de cereais não fortificada	61
Figura 8.6 – Cromatograma da amostra de cereais fortificada com 4 ng/ml de ocratoxina A	61
Figura 8.7 – Cromatograma da amostra de café não fortificada	62
Figura 8.8 – Cromatograma da amostra de café fortificada com 4 ng/mL com uma diluição (1:2)	62

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Teores máximos ($\mu\text{g/Kg}$) estabelecidos pela União Europeia para diferentes produtos alimentares	18
Tabela 7.1 – Curva de Calibração	48
Tabela 7.2 – Condições cromatográficas.....	50
Tabela 8.1 – Padrões da curva de calibração e o respetivo sinal cromatográfico	53
Tabela 8.2 – Áreas dos picos, valor médio, desvio padrão e variância dos padrões 0,500 ng/mL e 10,0 ng/mL	55
Tabela 8.3 – Análise ao sistema cromatográfico para a o padrão 0,500 ng/mL	56
Tabela 8.4 – Concentração do padrão e respetivo sinal instrumental, razão entre o sinal analítico e a concentração do padrão e a percentagem de linearidade para cada ponto da reta e a média das razões	56
Tabela 8.5 – Resultado da avaliação da repetibilidade para uma amostra de cereais e café torrado	58
Tabela 8.6 – Resultado da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de cereais e café, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista.....	60
Tabela 8.7 – Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de cereais e café	63

Lista de Abreviaturas

CH₃COOH, Ácido acético glacial
CV, Coeficiente de variação
EFSA, *European Food Safety Authority*
ELISA, *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
EN, *European Standard*
ESI, Eletronebulização
FLD, Fluorescência
GC-MS, Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GFC, Cromatografia de filtração em gel
GPC, Cromatografia de permeação em gel
HPLC, Cromatografia líquida de alta eficiência
IAC, Colunas de imunoafinidade
IARC, *International Agency for Research on Cancer*
ICP-MS, Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo
IEC, *International Electrotechnical Commission*
ISO, *International Standard Organisation*
IPAC, Instituto Português de Acreditação
KCl, Cloreto de potássio
LC-MS, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
LD, Limite de deteção
LQ, Limite de quantificação
MS, Espectrometria de massa
NaCl, Cloreto de sódio
NaOH, Hidróxido de sódio
Na₂HPO₄, Hidrogenofosfato dissódico
NaH₂PO₄, Dihidrogenofosfato de sódio
NP, Norma portuguesa
OGC, *Oil, gas and chemical*
OTA, Ocratoxina A
PBS, *Phosphate buffered saline*
SGS, *Société Générale de Surveillance*
UE, União Europeia
UV, Ultravioleta
UV-Vis, Ultravioleta - Visível

1. Introdução

1.1 Enquadramento

As micotoxinas, quando ingeridas, são consideradas muito prejudiciais para a saúde humana e animal. Uma vez que podem estar presentes em alimentos contaminados por fungos, constituem uma séria preocupação para a saúde pública em todo o mundo. A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, durante o transporte e/ou no armazenamento do produto, sendo por isso essencial a existência de planos de monitorização dos níveis de contaminação, de forma a serem tomadas medidas para reduzir o risco de contaminação. O processamento térmico é uma das medidas usadas. No entanto a ocratoxina A, foi considerada uma das micotoxinas mais tóxicas por ser termoestável, pelo que pode não ser eliminada por processos que envolvam temperaturas elevadas. Posto isto, é de extrema importância a existência de regulamentos que indiquem os limites máximos aceitáveis de micotoxinas em alimentos para consumo, assim como a necessidade de se realizarem análises de rotina para verificar o cumprimento da lei em produtos alimentares comercializados.

Assim, considerando a ocratoxina A uma das micotoxinas mais preocupantes devido à sua toxicidade, às suas características e por estar presente em alimentos que são consumidos diariamente, como os cereais e os seus derivados e o café, este trabalho teve como objetivo a realização e validação de um método analítico para a sua quantificação, nesses mesmos produtos, no laboratório de química da SGS Portugal.

A SGS Portugal já tinha o teste *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) implementado para a determinação de ocratoxina A, mas por se tratar de um método pouco preciso e sensível e suscetível a fatores físico-químicos, a metodologia utilizada no presente trabalho para a sua quantificação foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O método de HPLC é usado para separar e quantificar os compostos em estudo, embora tenha um custo mais elevado que o ensaio imunológico, tem a vantagem de ter uma elevada qualidade de separação, um baixo limite de deteção, uma alta sensibilidade e capacidade de automação. Quando combinado com as colunas de imunoafinidade, usadas para purificar e isolar as micotoxinas presentes nas amostras, e um detetor de fluorescência, utilizado por ser de fácil utilização, mais barato que o espectrómetro de massa (MS) e por a ocratoxina A apresentar uma fluorescência natural, esta técnica torna-se mais vantajosa para a quantificação desta micotoxina.

Os resultados de uma validação servem para avaliar a qualidade, fiabilidade e precisão dos resultados analíticos obtidos.

Para a validação do método, o processo utilizado consistiu em confirmar se o procedimento analítico realizado era adequado para a finalidade pretendida. Segundo o Guia Relacre nº13, os requisitos mínimos a serem considerados para uma análise quantitativa são a curva de calibração (gama de trabalho e linearidade), os limiares analíticos (limite de deteção e

limite de quantificação), a precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e a exatidão através de ensaios de recuperação.

1.2 Estrutura

No capítulo 1 é feito um enquadramento inicial do trabalho e é apresentada a estrutura do mesmo.

O capítulo 2 caracteriza a empresa onde foi desenvolvida a componente prática da dissertação. Onde são apresentados os dados históricos do Grupo, assim como os setores de atividade em que atua e os membros administrativos que o constituem.

O capítulo 3 refere-se aos efeitos das micotoxinas na saúde humana, focando-se mais no risco de contaminação de ocratoxina A em cereais e café. Também são mencionados os limites máximos legislados para vários produtos alimentares.

No capítulo 4 são apresentados vários métodos analíticos usados na determinação e quantificação de ocratoxina A.

Visto neste trabalho ter sido aplicado o método de HPLC para a quantificação da ocratoxina A, no capítulo 5 é explicado todo o seu funcionamento.

No capítulo 6 são referidos os parâmetros mínimos necessários que devem ser avaliados para se poder realizar o processo de validação de um método analítico.

No capítulo 7 são descritos os reagentes, materiais e equipamentos utilizados, assim como os passos efetuados no método experimental que foi posteriormente validado, para as amostras de cereais e café.

No capítulo 8 estão apresentados os parâmetros analisados para o processo de validação, como também os resultados obtidos juntamente com uma breve discussão.

O capítulo 9 corresponde à conclusão do trabalho. Onde são abrangidos os aspetos fundamentais deste trabalho prático, bem como referidas as perspetivas futuras.

2. Caracterização da empresa

2.1 SGS – *Société Générale de Surveillance, S.A*

O Grupo SGS está estabelecido como um símbolo de referência na prestação de serviços de excelência e está associado a valores como a independência, a qualidade, a integridade, a confidencialidade e a inovação. De modo a garantir uma formação consistente, eficaz e de alta qualidade aos colaboradores do Grupo assim como a outras empresas foi criado a *SGS Academy*. A SGS ao organizar os laboratórios por centros de competência regionais conseguiu uma cobertura multidisciplinar e mundial para qualquer tipo de produto: alimentares, cosméticos, químicos e petroquímicos, gases, materiais de construção, máquinas, vestuário e têxteis-lar, cerâmicas, brinquedos, eletrodomésticos e outros aparelhos eletrónicos, surgindo assim o SGS MULTILAB.

Neste Grupo está englobada a SGS Portugal que se encontra atualmente sediada no Pólo Tecnológico de Lisboa, e apresenta uma rede de escritórios de norte a sul do país como também nos arquipélagos dos Açores e da Madeira e laboratórios em Lisboa, Trafaria e Sines. Inicialmente, afiliada com sede na baixa Lisboa, foi criada para se dedicar ao controlo de operações de carga e descarga de cereais a granel, sendo posteriormente alargada a sua atividade para outros setores adaptando-se às mudanças e exigências do mercado, nunca esquecendo os princípios e valores do Grupo. A SGS Portugal detém diversas competências, inclusive na área da Gestão da Qualidade, assim por uma questão de maior eficiência estas foram agrupadas no SGS MULTILAB que é composto pelo Laboratório de Análises Físico-Químicas, Microbiológicas e Amostragem, atuando na área alimentar, cosmética, águas de consumo e resíduos; Laboratório de Ensaios de Ambiente e Segurança, Laboratório de Ensaios Não Destrutivos e Laboratórios de OGC (*oil, gas and chemical*) (SGS, <http://www.sgs.pt/>).

Na Figura 2.1 estão exibidos os logótipos atuais do Grupo SGS, estabelecidos em 2002.



Figura 2.1 - Logótipos do Grupo SGS

2.1.1 Enquadramento histórico

A SGS surgiu em 1878 na cidade de Rouen em França, sob o nome “Goldstück e Hainze & C^a” e tinha como atividade inicial a inspeção e verificação da qualidade e quantidade do grão a granel que chegava ao porto de Rouen. Ao fim do primeiro ano a companhia já tinha

aberto três escritórios nos maiores portos de França e em 1913 tornou-se líder no negócio de inspeção de grão a granel na Europa. Já sediada em Genebra na Suíça, em 1919 a empresa adotou o nome cuja sigla ostenta até hoje, SGS - *Société Générale de Surveillance* (SGS, 2012).

A SGS Portugal foi fundada em 1922 fazendo-se representar pela mão de Ronald Garland Jayne, em nome da empresa Garland Laidley, ainda hoje uma referência na logística e navegação. Possivelmente devido à instabilidade política que se fez sentir pela instauração da Ditadura Militar e fim da Primeira República Portuguesa, em 1926 a gestão da empresa foi delegada a René Aberlé pela sua experiência de trabalho com transações de trigo. Em 1928, o Grupo SGS cresceu internacionalmente, com oficiais e afiliadas em 21 países ao redor do mundo (SGS, 2012; 2014).

Em 1938, o primeiro português a ser contratado pela companhia Portuguesa foi Fernando Pereira, que se tornou numa figura marcante durante os seus 50 anos de serviço, por ser o responsável pela continuidade da SGS Portugal na liderança do mercado como também por ter sido o primeiro gerente português nomeado em 1960. Em 1939 a SGS expandiu-se para a inspeção e análise de matérias-primas, minerais e metais através da aquisição de laboratórios na Europa e inicia a sua atividade na América do Sul, com escritórios na Argentina e Brasil, prestando serviços de inspeção agrícola (SGS, 2014).

Na década de 60 a SGS iniciou a supervisão a produtos petrolíferos ao adquirir empresas na Bélgica, já no final dos anos 60 obteve a Redwood, empresa com referência mundial no setor petroquímico, nascendo assim a área da supervisão de produtos petroquímicos também em Portugal. A partir daí a companhia Portuguesa começou a ter a sua própria identidade e deixou de ser simplesmente uma representação de Genebra. A SGS Portugal ao longo dos anos foi fazendo contratos governamentais que permitiram o crescimento da empresa e lhe impulsionaram diversas competências, passando a atuar não só na área da inspeção como também na produção de produtos agroalimentares e têxteis (SGS, 2012).

No início da década de 80 a empresa tomou a decisão de abrir uma filial no Porto, sendo nesta altura que a Garland a deixou de representar, ficando sob a chefia de Eugénio Costa, um inspetor com grande experiência em Angola e que pretendia fazer carreira em Portugal. Eugénio Costa chefiou as áreas da supervisão agroalimentar e minérios no norte, durante o resto da sua carreira. A importância da indústria têxtil no norte levou à expansão da filial levando não apenas à abertura de um laboratório, como à aquisição do entreposto de algodão em rama na Maia. O laboratório têxtil foi o primeiro em Portugal a ter implementado o Sistema de Gestão da Qualidade. Devido à dificuldade na capacidade de resposta dos laboratórios externos subcontratados a SGS decidiu, no final dos anos 80, abrir um laboratório agroalimentar em Lisboa pela mão de Joaquim Martinho, engenheiro químico que entrou na companhia em 1975, o único licenciado dos quadros, e que em 1992 se tornou no primeiro laboratório privado deste setor a ser acreditado. Nessa altura, a SGS tem 113 escritórios, 57 laboratórios e 9500 funcionários atuando em mais de 140 países (SGS, 2012; 2014).

Em 1996, surgiu um serviço completamente inovador em Portugal: as peritagens automóveis. Face às necessidades de eficiência na resolução dos sinistros automóveis as seguradoras procuravam uma solução que oferecesse confiança aos consumidores, assim o Bernhard Paul, administrador da SGS Portugal desde 1995, lançou um desafio para o desenvolvimento de um serviço em *outsourcing* da gestão dos sinistros automóveis, serviço esse que já existia no Grupo na Bélgica e que nasceu oficialmente em Portugal no ano 1997. Com a ajuda financeira do Programa Estratégico de Dinamização da Indústria Portuguesa (PEDIP) foi possível um grande salto tecnológico, em 1997, transferindo-se a sede da SGS Portugal para o Cacém, após a construção de raiz de novas instalações e da aquisição de equipamentos mais modernos. Em 1998, a Certificação de Organizações adquiriu uma estrutura própria na SGS em Portugal (SGS ICS), sendo o primeiro a obter a acreditação para a Certificação de Sistemas de Gestão da Qualidade (ISO 9001), também nesse ano a companhia criou o organismo de Ensaios não destrutivos. Um ano depois foi lançado o serviço do cliente mistério – *Mystery Shopping* – com a aquisição da empresa Lodge service.

No final da década de 90 e início do novo milénio a SGS Portugal chegou às ilhas sob a direção de Rui Cordeiro e em 2003 nasceu a *SGS Academy*, entidade formadora da SGS. A sede situada no Cacém foi transferida em 2005 para o Lumiar onde se encontra atualmente instalada e reúne todos os serviços (escritórios e SGS MULTILAB) (SGS, 2012).

Atualmente, a SGS opera numa grande variedade de setores industriais empregando mais de 80000 pessoas em todos os seus escritórios e laboratórios existentes em quase todos os países do mundo. O Grupo tem crescido constantemente para se tornar o líder da indústria que é hoje, resultado da melhoria contínua da inovação, da redução dos riscos, da produtividade e da eficiência das suas operações (SGS, 2014).

2.1.2 Organização administrativa

Como em qualquer empresa, é fundamental haver uma combinação de esforços e responsabilidades entre indivíduos para ser possível alcançar objetivos a nível coletivo, que seriam inatingíveis caso se tratasse de uma só pessoa.

O Conselho Operacional é composto por vários especialistas sendo que cada negócio é liderado por um vice-presidente executivo e cada região é liderada por um *Chief Operating Officer*. O grupo reúne-se regularmente ao longo do ano para determinar as estratégias e prioridades da empresa e analisar o seu desempenho (SGS, 2014).

A SGS é liderada por um grupo dinâmico de pessoas com muitos anos de experiência nas respetivas áreas em que atuam.

Deste modo, o modelo organizacional da SGS permite uma rentabilização máxima das metodologias de trabalho nas diferentes funções e regiões.

2.1.3 Competências/Setores de Atividade

A SGS é composta por vários especialistas internacionais que fornecem serviços em todo o mundo, operando de forma eficiente e sustentável, aprimorando processos, melhorando a qualidade e produtividade, reduzindo riscos, verificando conformidade e agilizando a chegada dos produtos ao mercado. As principais competências da SGS são a inspeção, verificação, ensaio e certificação que são continuamente melhoradas para se tornar na organização prestadora de serviços mais produtiva e competitiva do mundo (SGS, 2014; 2016).

Os benefícios oferecidos pela SGS são: i) segurança, pois ajuda as organizações a desenvolver sistemas de saúde e de segurança eficazes para proteger os trabalhadores, o que gera confiança ao consumidor; ii) qualidade, porque garante ao cliente a conformidade e a qualidade dos produtos e serviços prestados; iii) confiança, uma vez que a empresa fornece soluções de inspeção, verificação e certificação transparentes e imparciais podendo o cliente dar garantia dos seus produtos e serviços; iv) sustentabilidade, por encorajar os trabalhadores a terem responsabilidade ambiental e a reduzir o risco de corrupção nos projetos dos clientes; v) produtividade, dado a existência de formações que permitem o desenvolvimento de competências especializadas do pessoal dos clientes; vi) redução do risco, devido aos serviços disponibilizados pelo Grupo para fornecer soluções de gestão de risco conforme o legislado nas normas; vii) rapidez a entrar no mercado, por facultar serviços de consultadoria, independentemente da indústria, que vai permitir ao cliente superar os desafios para entrar no mercado (SGS, 2016).

A SGS é líder de mercado por atuar em vários setores da indústria, dos quais fazem parte o setor da agricultura & alimentação em que a empresa oferece soluções que garantam que os seus produtos estejam conforme os padrões internacionais e cheguem com segurança à mesa do consumidor; a indústria automóvel onde o Grupo disponibiliza serviços que se concentram na conceção, construção e operação de soluções de inspeção de veículos em todo o mundo, aumentando a segurança dos automóveis, assim como ajuda a melhorar o desempenho e a redução de riscos. Devido ao crescente uso de produtos químicos a SGS entra neste mercado oferecendo serviços laboratoriais que testam a segurança dos produtos e para ajudar a controlar o uso destes de acordo com os limites legislados. Processos seguros, eficientes e confiáveis são essenciais para a construção de edifícios ou infraestruturas, processos esses suportados por estudos de viabilidade de construção, avaliação de risco e gestão e por materiais de qualidade fornecidos pela SGS. No setor de bens de consumo e retalho, como tecidos, aparelhos e alimentos, os serviços prestados pela empresa garantem a sua qualidade, conformidade e segurança. Esta entidade também apoia o setor da energia apostando nas energias renováveis por ter em consideração o impacto ambiental. Já no setor das finanças a companhia oferece aos seus clientes orientações em várias áreas relacionadas com serviços de gestão financeira de projetos. No setor industrial, a equipa apoia os fabricantes quanto à integridade, segurança e confiança das suas atividades a fim de garantir que os processos e projetos cumpram todos os requisitos de qualidade e desempenho. Os serviços

disponibilizados pelo Grupo SGS como testes analíticos, ensaios clínicos e gestão de processos, no setor das ciências biológicas, permitem que os produtos farmacêuticos cheguem rapidamente ao mercado, com custos mínimos e segurança máxima. Outro dos departamentos na qual a firma atua é na logística, onde ajuda os seus clientes a desenvolver e aumentar os seus negócios. Pode-se também encontrar esta companhia na indústria mineira por exhibir conhecimento especializado relativamente aos locais de mineração e no setor do petróleo & gás uma vez que apresenta um sólido conhecimento e dedicação quanto à qualidade e segurança, o que lhe permite oferecer soluções inovadoras (SGS, 2014; 2016).

3. Micotoxinas

As micotoxinas englobam uma enorme diversidade de compostos químicos com potencial tóxico, que são originados por fungos (Martins, 2003). Na natureza, são vários os fungos capazes de as produzir, sendo estas patogénicas para o Homem e os animais (Nogueira & Oliveira, 2006). São produzidas pelo metabolismo secundário dos fungos e podem estar presentes num elevado número de produtos alimentares e ração animal. Ao contrário dos metabolitos primários, que são essenciais ao crescimento do fungo, estes metabolitos são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor. Geralmente são produzidos quando grandes quantidades de precursores de metabolitos primários são acumulados, dependendo também da temperatura, pH e humidade (Fani, 2012; Silva, 2013).

Estas toxinas são formadas sob condições ambientais específicas no campo (pré-colheita), no período de pós-colheita, durante o armazenamento, processamento e distribuição (Uekane *et al.*, 2010). As culturas que permanecem mais tempo no campo são mais suscetíveis ao ataque fúngico e, por isso, podem apresentar maiores níveis de micotoxinas (Cacique, 2012). Um esquema genérico da produção de alimentos até à chegada ao consumidor está exemplificado na Figura 3.1.

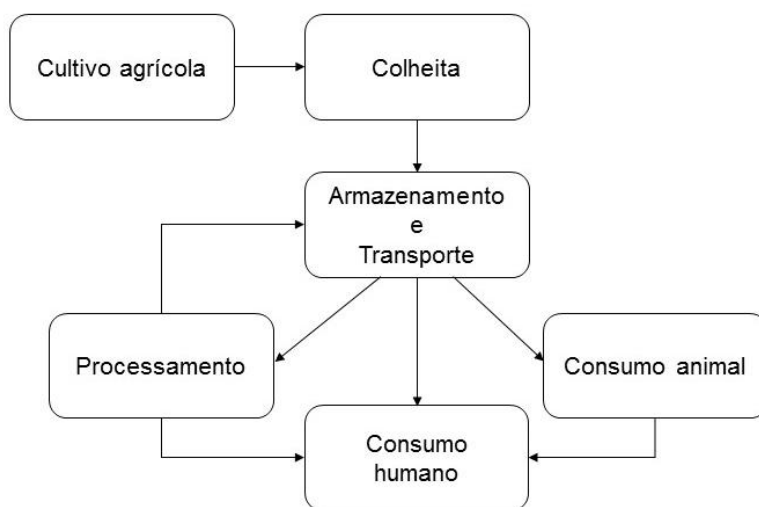


Figura 3.1 - Diagrama representativo das fases de produção de alimentos até ao consumo humano (Adaptado de Serra, 2005).

Os fungos são capazes de germinar, crescer e produzir toxinas numa grande variedade de produtos agrícolas. Mas para isso acontecer devem existir condições favoráveis, sendo os principais fatores a humidade (mais precisamente, a atividade da água) e a temperatura do produto. Assim, sabe-se que os fungos em alimentos devidamente secos não se conseguem desenvolver. Por isso, a secagem eficiente dos produtos e a sua conservação sem humidade é uma arma eficaz contra o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas. No caso dos

cereais, grãos de café, frutos e sementes oleaginosas, após colheita as culturas devem ser secas imediatamente. A manutenção de alimentos com uma atividade da água abaixo de 0,7 é uma técnica eficaz usada mundialmente para controlar estragos provocados por fungos em alimentos. Condições apropriadas de armazenamento também são de grande importância (Fani, 2012; FIB, 2009; Serra, 2005).

Estima-se que 25 % da produção mundial e 20 % da produção europeia de alimentos podem estar contaminadas com estas toxinas, originando graves consequências tanto a nível da segurança alimentar como a nível socioeconómico (Nogueira & Oliveira, 2006; Uekane *et al.*, 2010). As micotoxinas normalmente encontram-se nos cereais, frutos secos, cacau, café, vinhos e carne, especialmente se a atividade da água e a temperatura não forem devidamente controladas (FIB, 2009; Lidon *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2012). Esses alimentos quando contaminados e ingeridos podem causar diversas doenças, agudas e crónicas, e em casos extremos a morte, tanto em pessoas como em animais, o que suscita uma preocupação por parte de diversas organizações internacionais. As intoxicações associadas à ingestão de alimentos ou rações contaminadas com estes metabolitos são chamadas de micotoxicoses (Martins, 2003). As micotoxinas podem afetar principalmente o fígado e os rins e o sistema nervoso, endócrino e imunitário, dependendo a gravidade dos seus efeitos da sua toxicidade, do grau e do tempo de exposição, da idade e do estado nutricional do indivíduo ou, até mesmo, de eventuais sinergias entre diversas micotoxinas que possam estar presentes em simultâneo nos alimentos (Nogueira & Oliveira, 2006; Pereira, 2008). Em termos de exposição e severidade de lesões crónicas, estima-se que as micotoxinas apresentem um risco maior que os contaminantes antropogénicos (pesticidas e aditivos), considerando como principal via de exposição a ingestão de alimentos contaminados, apesar de existirem casos esporádicos por inalação e por contacto com a pele (Murray, 2014; Serra, 2005).

Por se ter em consideração o citado acima, as micotoxinas são sentenciadas como o principal risco alimentar na União Europeia (UE), uma vez que a sua presença, em níveis superiores aos considerados toleráveis, representam uma ameaça para a segurança alimentar e um risco para a saúde pública. As ocratoxinas e as aflatoxinas são dois grupos de micotoxinas de elevado significado nos alimentos, não só pela sua incidência, mas também pelo elevado nível de toxicidade que apresentam sobre os humanos e animais. Daí a necessidade da adoção de leis para limitar a exposição do consumidor a estes contaminantes e, a avaliação dos alimentos contaminados ser um fator de grande importância (Silva, 2013; Vieira *et al.*, 1999).

3.1 Ocratoxina A

As ocratoxinas consistem num grupo de, no mínimo, sete metabolitos secundários relacionados estruturalmente, sendo que já foram relatadas a ocorrência natural de ocratoxina A, B e C em produtos vegetal e animal. No entanto, a ocratoxina A (OTA) destaca-se pela

maior toxicidade e ocorrência natural em determinados produtos (Fani, 2012; Souza *et al.*, 2010; Uekane *et al.*, 2010).

A OTA é uma micotoxina produzida por várias espécies de fungos do género *Aspergillus* (Figura 3.2), em climas mais quentes e tropicais e, de *Penicillium* (Figura 3.3), em climas mais temperados (Onorio *et al.*, 2011; Patono *et al.*, 2011).

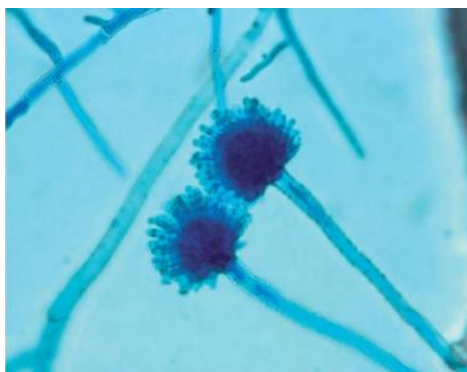


Figura 3.2 – Exemplo de um fungo do género *Aspergillus* (Murray, 2014)



Figura 3.3 – Exemplo de um fungo do género *Penicillium* (Houbraken & Samson, 2011)

Os fungos ocratoxigénicos por estarem amplamente distribuídos no ambiente, os alimentos ficam sujeitos a hospedá-los, podendo ou não germinarem, crescerem e produzirem toxinas. Isto porque se considera que as variações regionais e sazonais estão diretamente relacionadas com o tipo de toxina produzida (Ribeiro, 2007). Esses microrganismos podem contaminar os produtos alimentares antes da colheita ou, mais frequentemente, durante o armazenamento, por essa razão o controlo destas etapas, com a aplicação de protocolos de prevenção, é indispensável para reduzir a contaminação dos alimentos para níveis aceitáveis (Duarte *et al.*, 2010; EFSA, 2006; Kabak, 2009).

A ocratoxina A entra na cadeia alimentar do Homem, por ser uma molécula moderadamente estável ao sobreviver à maioria dos tipos de processamento utilizados na produção de alimentos (Ribeiro, 2007). Já foi detetada em frutos secos, leguminosas, cacau,

especiarias, bebidas como o vinho, sumo de uva e a cerveja, assim como em produtos de origem animal, mas surge principalmente em produtos derivados de cereais e em café (CFS, 2014; Coronel *et al.*, 2012; EFSA, 2006). No caso dos cereais, a contaminação ocorre essencialmente durante a fase de armazenamento, especialmente em condições de humidade favoráveis. Já no café, surge principalmente durante a fase da colheita e na secagem dos grãos. Relativamente à contaminação das uvas e do vinho verifica-se que à medida que o processo de maturação avança a incidência de fungos ocratoxigénicos nas uvas aumenta. A contaminação da cerveja resulta da utilização de malte e cereais infetados durante o armazenamento e na carne tem essencialmente origem na ingestão de rações contaminadas (Nogueira & Oliveira, 2006).

O tipo de processamento e/ou tratamento utilizado nos produtos podem ser responsáveis pela diminuição da contaminação inicial por ocratoxina A, embora se considere a OTA um composto estável por não ser destruído por meio de processos de preparação de alimentos comuns, sendo necessárias temperaturas superiores a 250 °C durante vários minutos, para reduzir a sua concentração (EFSA, 2006). Por exemplo durante o fabrico da cerveja verifica-se que os teores de OTA vão diminuindo, provavelmente devido à hidrólise proteolítica da ligação peptídica durante a maltagem. Foi demonstrado que cerca de 70 % dos teores de OTA são eliminados durante todo o processo de produção da cerveja. Nos vinhos também se observa alterações nos níveis de contaminação, havendo diferenças entre o vinho tinto e branco. No vinho tinto a contaminação costuma ser superior ao vinho branco pois ao contrário do que acontece com este último, na fermentação o mosto e as películas fermentam em conjunto, para permitir a extração de compostos corados e aromas, o que poderá maximizar a passagem de alguma micotoxina das películas para o mosto (Nogueira & Oliveira, 2006; Ribeiro, 2012). Apesar de tudo, a OTA é encontrada em vários produtos alimentares processados e persiste através da cadeia alimentar, uma vez que é detetada em sangue de humanos e no leite materno (Pereira, 2008). Portanto, considera-se que as micotoxinas podem surgir de três formas nos alimentos processados, podem estar presentes na matéria-prima, formar-se durante o processamento ou após o processamento, devido a más condições de armazenamento ou acondicionamento (Serra, 2005).

As micotoxinas podem afetar a saúde humana e animal. A ocratoxina A uma vez ingerida, por alimentos contaminados, é na maioria das espécies rapidamente absorvida no estômago, devido às suas características ácidas, seguindo-se de uma absorção lenta a nível intestinal, passando posteriormente para o sangue ao ligar-se à albumina e sendo distribuída aos vários órgãos. A OTA é um tóxico cumulativo com uma rápida absorção mas, com uma eliminação lenta, constituindo um risco acrescido para os humanos uma vez que o tempo de semi-vida desta toxina é de 35 dias (Nogueira & Oliveira, 2006; Ribeiro, 2007; Souza *et al.*, 2010).

Desde 1965 que vêm sendo assinalados casos de intoxicações e doenças em animais e humanos, desencadeadas pela ocratoxina A (Martins *et al.*, 2007). Nos seres humanos, a ingestão de grandes quantidades de OTA foi associada à nefropatia endémica dos Balcãs, uma

nefropatia crónica descrita em várias regiões rurais da Bulgária, Roménia, Sérvia, Croácia e Bósnia. No entanto, a causa ainda não foi estabelecida (Walker & Larsen, 2005). Nas aves, verificou-se a diminuição da concentração de glicogénio, provocada pela inibição do transporte ativo da glucose no fígado, pela supressão da síntese de glicogénio a partir da glucose e pela aceleração da decomposição de glicogénio. Este efeito tem sido atribuído ao decréscimo da glicogénese devido à inibição pela OTA de uma enzima, a glicogénio sintetase (Martins *et al.*, 2007). Tendo em conta todos os dados existentes sobre a toxicidade da ocratoxina A, no painel de contaminantes da cadeia alimentar da *European Food Safety Authority* (EFSA) considera-se que é um veneno natural altamente tóxico para os rins por se acumular principalmente nestes órgãos, embora também seja conhecida como uma micotoxina que apresenta propriedades cancerígenas, teratogénicas, embriotóxicas e possivelmente, neurotóxicas (EFSA, 2006; FAO, 2006; Ribeiro, 2012). A IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classificou a ocratoxina A como provável agente carcinogénico para os humanos, pertencendo ao Grupo 2B uma vez que existem evidências comprovadas em animais de laboratório mas não em seres humanos (IARC, 1993).

Quimicamente, as ocratoxinas são derivados α e β da fenilalanina unida por uma ligação amina a uma 3,4-dihidroisocumarina, sendo a ocratoxina A a mais conhecida e importante, possuindo polaridade média e alta estabilidade térmica (Martins *et al.*, 2007; Uekane *et al.*, 2010). A OTA é um composto cristalino incolor de fórmula empírica $C_{20}H_{18}O_6NCl$ que possui um peso molecular de 403,8 g/mol, sendo a sua estrutura química, constituída por uma molécula de cloro, responsável pelo carácter tóxico, representada na Figura 3.4 (Nogueira & Oliveira, 2006). A ocratoxina A é muito solúvel em solventes orgânicos polares e fracamente solúvel em água e, caracteriza-se por emitir fluorescência verde azulada quando excitada com radiação ultravioleta de comprimento de onda igual a 366 nm, que muda para uma fluorescência azul escura quando exposta a vapores de amónia (Pereira, 2008).

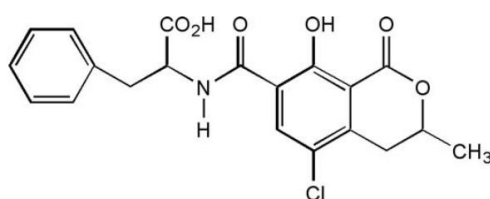


Figura 3.4 – Estrutura química da ocratoxina A

Tendo em conta o referido acima, a pesquisa desta micotoxina em géneros alimentícios e em alimentos para animais é um instrumento essencial para controlar a respetiva ocorrência e prevenir os riscos associados (Martins *et al.*, 2007).

3.1.1 Principais Alimentos contaminados por ocratoxina A

3.1.1.1 Cereais

Os cereais são a semente comestível de plantas pertencentes à família *Gramineae* e foram as primeiras espécies de plantas cultivadas por seres humanos, e por mais de dez mil anos têm sido o alimento básico para muitas sociedades humanas. São classificados como o grupo mais importante de culturas alimentares produzidas no mundo para a dieta humana. Pois além do elevado teor de amido como fonte de energia, os cereais fornecem fibra, proteína e lípidos ricos em ácidos gordos essenciais. Estima-se que o consumo mundial de cereais fornece cerca de 50 % de proteína e energia necessária para a dieta do Homem (Duarte *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014).

Existe uma grande variedade de utilizações para este produto. O pão é um dos produtos mais importantes, sendo especialmente feito de trigo, centeio e milho. Os cereais de pequeno-almoço também são outro produto que são cada vez mais consumidos em todo o mundo, assim como produtos de panificação, como os biscoitos e bolos. Também são utilizados na preparação de bebidas alcoólicas, como a cerveja (Duarte *et al.*, 2010).

Entre 2002 e 2008, a presença de micotoxinas em alimentos foi um dos incidentes que mais violou a segurança alimentar europeia (Pereira *et al.*, 2012). Podendo por exemplo as farinhas, devido à sua vasta utilização tanto a nível industrial como doméstico, servir de transporte para vários tipos de contaminantes, inclusive as micotoxinas (Roseto & Delai, 2013).

A ocratoxina A é considerada um contaminante típico dos cereais, uma vez que, na Europa, cerca de 50% da sua ingestão vem deste produto e dos seus derivados. Portanto, é cada vez mais importante o controlo deste contaminante nos cereais, porque a sua presença no alimento pode causar danos para a saúde humana e animal (Vieira *et al.*, 1999).

O tipo de tratamento utilizado nos produtos pode interferir nos níveis de ocratoxina A. No caso dos cereais, os processos físicos de lavagem e de moagem dos grãos não são suficientes para eliminar os teores de OTA dos grãos contaminados, uma vez que grande parte permanece nas partes internas (fibra e glúten). Contudo, na produção de farinha algumas partes do grão de trigo são removidas, reduzindo provavelmente as concentrações de OTA na farinha e nos produtos derivados (Nogueira & Oliveira, 2006). A qualidade das farinhas pode ser avaliada considerando diversas características como a humidade, os minerais, os lípidos e proteínas, que refletem o efeito benéfico e avaliam a qualidade tecnológica e nutricional do produto. Um dos pontos-chave no controlo das micotoxinas em cereais é estabelecer as condições ótimas de armazenamento, como uma boa ventilação, temperatura e humidade, por principalmente estes dois últimos fatores serem considerados críticos para o crescimento de fungos e para a produção de micotoxinas (Vieira *et al.*, 1999).

A quantidade ingerida de ocratoxina A, através de cereais, depende da sua concentração nestes alimentos, da quantidade de cereais consumidos e da frequência de consumo (Villa & Markaki, 2009; Vidal *et al.*, 2014). Os principais contributos para a dose diária

de ocratoxina A são dados pelos cereais e produtos à base destes. No entanto, considera-se que o tratamento térmico diminui o teor de micotoxinas nos cereais contaminados, embora alguns estudos com farinha contaminada relatem que esta substância química é estável a temperaturas elevadas, e que a sua concentração não diminui durante a cozedura. Daí a prevenção ser especialmente importante para evitar ao máximo as contaminações e proteger os consumidores. Para isso, são fixados limites máximos para os cereais e seus derivados assim como aplicadas ações preventivas destinadas a evitar contaminações em todas as fases da cadeia de produção e de comercialização (Vidal *et al.*, 2014).

3.1.1.2 Café

O café é um produto agrícola importante no mundo, sendo produzido em 78 países, representando grande parte dos recursos de países em desenvolvimento (Uekane *et al.*, 2010). A planta do café pertence à família *Rubiaceae* e ao género *Coffea* L., apesar de estarem descritas mais de 66 espécies do mesmo género, somente duas são cultivadas e comercializadas em todo o mundo, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, conhecidas internacionalmente como o café arábica e robusta, respetivamente (Azevedo, 2015; Uekane *et al.*, 2010). O café arábica apresenta um menor teor de cafeína, uma acidez mais elevada, um menor amargor, um aroma mais intenso e um sabor mais fraco comparativamente ao café robusta (Azevedo, 2015). O fruto do cafeeiro usualmente chamado de cereja é normalmente composto por dois grãos, que são extraídos e secos resultando em dois grãos de café verde, como exemplificado na Figura 3.5, que são depois torrados (FAO, 2006). A etapa de extração geralmente pode ser efetuada por dois métodos: via seca ou via húmida. A principal diferença entre eles reside no facto de na via húmida os frutos serem despulpados e sujeitos ao processo de fermentação antes da secagem, o que não se verifica na via seca, na qual os frutos são colhidos e secos inteiros ao sol (Martins, 2003).



Figura 3.5 – Fruto do cafeeiro constituído por dois grãos (Azevedo, 2015)

A maioria dos consumidores de café provavelmente nunca ouviu falar da ocratoxina A. Neste produto, os principais fungos responsáveis pela sua produção são os *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* (FAO, 2006).

A ocratoxina A é considerada uma preocupação para toda a cadeia alimentar do café. A principal causa de crescimento de OTA são as más práticas de colheita e pós-colheita do café. Em particular, uma secagem incompleta dos grãos de café pode resultar num ambiente propício ao crescimento de fungos que poderão resultar na formação de ocratoxina A. Após a

secagem, o café verde é normalmente armazenado durante dias, semanas ou meses, durante o qual os teores de humidade devem ser mantidos baixos o suficiente para evitar o crescimento de fungos (FAO, 2006; Wakefield & Company Limited, 2015). No entanto, considera-se que a torrefação do café reduz os teores de OTA nos grãos, provavelmente devido às reações químicas que ocorrem durante este processo, ou seja, a aplicação de boas práticas durante o tratamento, armazenamento e processamento do café ajuda a manter baixo os níveis de humidade e de temperatura, sendo essencial para evitar ou reduzir a contaminação de grãos de café verde com OTA (CFS, 2014; Nogueira & Oliveira, 2006; Romani *et al.*, 2003).

A torra é uma etapa indispensável para obter a bebida, pois provoca alteração da cor, perda de peso, aumento do volume e diminuição da humidade do grão do café, surgindo através deste processo os sabores e aromas característicos do café. Sendo também responsável pela diminuição drástica de OTA, por envolver altas temperaturas (Azevedo, 2015; Romani *et al.*, 2003). No entanto, a temperatura aplicada deve ser cuidadosamente controlada pois pode afetar as propriedades organoléticas do produto e causar a ocorrência de vários metabolitos tóxicos. Apesar desta tendência de redução da OTA no café, o número de alertas distribuídos entre os países da UE, quanto à deteção desta micotoxina no café, aumentou dramaticamente durante os três primeiros meses de 2013 relativamente aos anos anteriores (Serna *et al.* 2014).

Pouco depois da descoberta de ocratoxina A em café torrado, a União Europeia lançou um programa para harmonizar os regulamentos sobre micotoxinas nos géneros alimentícios (GACTA, 2007). Além disso, a legislação mais restritiva por parte da UE foi aprovada com relação à presença de OTA em grãos torrados, café torrado e moído e café instantâneo (Serna *et al.*, 2014). Devido ao citado e à importância económica do café no mundo e da exigência de padrões de qualidade, é de suma importância a existência de métodos para a determinação e quantificação de OTA devido ao risco potencial desta substância na saúde humana. Pesquisas em todo o mundo confirmaram a presença da OTA em café verde, torrado e solúvel em níveis variando de 20 a 360 µg/kg, em café verde e de 3,2 a 17 µg/kg, em café torrado. Esta diferença de teores entre o café verde e torrado pode ser explicado pela redução de OTA durante o processo de torrefação, podendo chegar a 90 %. Devido ao grande consumo de café pela população mundial e à presença de OTA na bebida, estima-se que 12 % da ocratoxina A ingerida seja proveniente da ingestão deste produto (Uekane *et al.*, 2010).

3.1.2 Legislação

De maneira a proteger a saúde pública torna-se necessário manter os contaminantes em níveis aceitáveis do ponto de vista toxicológico (ASAE, 2015).

Dada a ocorrência de ocratoxina A numa gama alargada de produtos alimentares e estando comprovada a exposição humana a esta micotoxina, diversos países têm adotado regulamentação adequada com o intuito de proteger os consumidores contra os efeitos nocivos da micotoxina, em alimentos *in natura* e processados e, para estabelecer barreiras à

comercialização de produtos contaminados com OTA acima de certos valores. Estas medidas juntamente com o controlo dos fatores que conduzem à formação da OTA, são elementos importantes para garantir que o consumidor está adequadamente protegido (Fani, 2012; Pereira, 2008).

No Continente Europeu 39 países, que representam 99 % da população europeia, apresentam legislações para a regularização de micotoxinas em alimentos e rações. Comparada com outras regiões do mundo, a Europa dispõe da mais completa e detalhada legislação sobre micotoxinas em alimentos (Fani, 2012; Freire *et al.*, 2007). Mas os peritos da saúde humana têm posições divergentes sobre as quantidades diárias de OTA que podem ser ingeridos sem riscos, por isso, para a elaboração das legislações é necessário ter em consideração vários fatores, como por exemplo os aspetos científicos, como a disponibilidade de informações toxicológicas, o conhecimento acerca da distribuição das micotoxinas nos alimentos, além da metodologia analítica e os aspetos políticos e económicos (Duris & Guyot, 2002; Pereira, 2008).

A União Europeia com o objetivo de controlar a exposição da sua população à ocratoxina A e com o intuito adicional de harmonizar os diferentes limites legais estabelecidos pelos seus países membros, estabeleceu teores oficiais máximos de alguns contaminantes através do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 de 19 de Dezembro tendo em conta o risco relacionado com o consumo dos alimentos. Relativamente à ocratoxina A os limites legislados para diferentes géneros alimentícios podem ser observados na Tabela 3.1, embora alguns produtos se encontrem ainda à espera da imposição de um limite legal (Pereira, 2008).

Tabela 3.1 – Teores máximos (µg/Kg) estabelecidos pela União Europeia para diferentes produtos alimentares (Regulamento (CE) n.º 1881/2006)

Produtos alimentares	Teores máximos (µg/Kg)
Cereais não transformados	5,0
Todos os produtos derivados de cereais não transformados, incluindo produtos à base de cereais transformados e cereais destinados ao consumo humano direto, com a exceção dos pontos ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3,0
Passas de uvas (uvas de corinto, uvas e sultanas)	10,0
Café torrado, moído ou em grão, com exceção do café solúvel	5,0
Café solúvel (café instantâneo)	10,0
Café verde, frutos secos que não uva passa, cerveja, cacau e produtos derivados do cacau, vinhos licorosos, produtos à base de carne, especiarias e alcaçuz	-
Vinho (incluindo vinho espumante e excluindo vinho licoroso e vinho com teor alcoométrico não inferior a 15 % vol.) e vinho de frutos ⁽³⁾	2,0 ⁽⁴⁾
Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas ⁽⁵⁾	2,0 ⁽⁴⁾
Sumo de uva, concentrado de uva reconstituído, néctar de uva, mosto de uva e concentrado de mosto reconstituído, destinados ao consumo humano direto ⁽⁶⁾	2,0 ⁽⁴⁾
⁽¹⁾ Alimentos à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾	0,50
⁽²⁾ Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos ⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾ especificamente destinados a lactentes	0,50

⁽³⁾ Géneros alimentícios enumerados nesta categoria, tal como definidos no Regulamento (CE) n.º 1493/1999 do Conselho de 17 de Maio de 1999 que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola (JO L 179 de 14.7.1999, p. 1) com a última redação que lhe foi dada pelo Protocolo relativo às condições e regras de admissão da República da Bulgária e da Roménia à União Europeia (JO L 157 de 21.6.2005, p. 29).

- (4) O teor máximo aplica-se aos produtos provenientes das colheitas a partir de 2005.
- (5) Géneros alimentícios enumerados nesta categoria, tal como definidos no Regulamento (CEE) nº 1601/91 do Conselho, de 10 de Junho de 1991, que estabelece as regras gerais relativas à definição, designação e apresentação dos vinhos aromatizados, das bebidas aromatizadas à base de vinho e dos cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas (JO L 149 de 14.6.1991, p. 1), com a última redação que lhe foi dada pelo Protocolo relativo às condições e regras de admissão da República da Bulgária e da Roménia à União Europeia. O teor máximo de OTA aplicável a estas bebidas depende da proporção de vinho e/ou mosto de uva presente no produto acabado.
- (6) Géneros alimentícios enumerados nesta categoria, tal como definidos na Diretiva 2001/112/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001, relativa aos sumos de frutos e a determinados produtos similares destinados à alimentação humana (JO L 10 de 12.1.2002, p. 58).
- (7) Géneros alimentícios enumerados nesta categoria, tal como definidos na Diretiva 96/5/CE, Euratom da Comissão, de 16 de Fevereiro de 1996, relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (JO L 49 de 28.2.1996, p. 17), com a última redação que lhe foi dada pela Diretiva 2003/13/CE (JO L 41 de 14.2.2003, p. 33).
- (8) O teor máximo refere-se à matéria seca. A matéria seca é determinada em conformidade com o Regulamento (CE) nº 401/2006.
- (9) Géneros alimentícios enumerados nesta categoria, tal como definidos na Diretiva 1999/21/CE da Comissão, de 25 de Março de 1999, relativa aos alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos (JO L 91 de 7.4.1999, p. 29).
- (10) O teor máximo refere-se, no caso do leite e dos produtos lácteos, aos produtos prontos a usar (comercializados como tal ou reconstituídos segundo as instruções do fabricante) e no caso de outros produtos que não o leite e os produtos lácteos, à matéria seca. A matéria seca é determinada em conformidade com o Regulamento (CE) nº 401/2006.

O cumprimento desta legislação obriga os agentes económicos a controlar a presença de certas micotoxinas em alguns alimentos e impede a comercialização dos produtos contaminados com valores acima dos regulamentados (Pereira, 2008). Assim, os produtos alimentares exportados sofrem controlos prévios à exportação de forma a verificar se os produtos oriundos de países terceiros satisfazem os requisitos da União Europeia, ou seja, para um país terceiro obter a aprovação é necessário demonstrar que os controlos efetuados antes da expedição são suficientemente eficazes e eficientes para substituírem ou reduzirem os controlos documentais, de identidade e físicos previstos na legislação da União Europeia (COM, 2010).

4. Métodos para determinação de ocratoxina A

A deteção e quantificação de micotoxinas em alimentos é essencial para avaliar quais os produtos responsáveis pela exposição da população a estes contaminantes, assim como para gerir e controlar os seus teores nos produtos alimentares (Serra, 2005). A determinação destas toxinas faz-se através de métodos analíticos adequados à finalidade a que se destinam. Atendendo à composição complexa de matrizes alimentares e ração animal, a concentração vestigial de micotoxinas encontrada nesses produtos, bem como a ampla gama de propriedades físicas e químicas destas, constata-se a necessidade de técnicas de deteção seletivas e sensíveis (Pereira *et al.*, 2014; Soleymani *et al.*, 2012). Assim, de modo a escolher o método mais adequado para a matriz em estudo é necessário ter em consideração vários fatores como a legislação, o equipamento disponível, o tipo de resultado pretendido (qualitativo ou quantitativo), o número de amostras a analisar e a validação das técnicas (Ribeiro, 2012).

Uma vez que a ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina, esta deve ser investigada nos alimentos, pelos motivos acima referidos. De forma a serem obtidos resultados credíveis, é necessário verificar o sistema de medição, ou seja, deve-se recorrer à validação dos métodos analíticos utilizados (Souza *et al.*, 2010; Uekane *et al.*, 2010).

Para a monitorização da presença de ocratoxina A em alimentos, já foram usados métodos cromatográficos tais como a cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espetrometria de massa (LC-MS) e espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS), assim como por métodos imunológicos como o teste ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). A união LC-MS é considerada uma das técnicas mais avançadas disponíveis para a deteção de toxinas (EFSA, 2004; Pereira *et al.*, 2014; Prella *et al.*, 2013; Soleymani *et al.*, 2012). No entanto, a técnica mais comum é baseada em colunas de imunoafinidade (IAC) em combinação com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seguida da deteção por fluorescência (FLD), tendo diferentes limites de quantificação, que variam desde 0,1 a 2 ng/mL. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para analisar um elevado número de cereais e os seus derivados assim como frutos secos (FAO/WHO, 2001; Prella *et al.*, 2013; Uekane *et al.*, 2010).

A complexidade das amostras requer um tratamento prévio, composto por várias etapas, antes de serem determinadas. A maioria dos métodos analíticos, utilizados para analisar a ocratoxina A, têm várias etapas em comum, como a amostragem, homogeneização, extração, separação/purificação e a deteção (Pereira *et al.*, 2014; Prella *et al.*, 2013).

A amostragem é apontada como a principal fonte de variação dos resultados, pois habitualmente só uma pequena percentagem do produto alimentar está contaminada, e se a amostra não for bem homogeneizada, a porção retirada para análise pode não ser representativa do produto em estudo. Ela deve ser aleatória, tendo os diferentes fragmentos a mesma probabilidade de ser escolhidos. Para homogeneizar amostras sólidas pode utilizar-se

um moinho por exemplo, sendo que quanto menor o tamanho das partículas, mais homogeneizada estará a amostra (Serra, 2005).

Para a extração de micotoxinas de alimentos sólidos, geralmente são empregados solventes orgânicos ou misturas de solventes orgânicos, como por exemplo diferentes proporções de metanol ou acetonitrilo, e água. Assume-se que a micotoxina extraída vai estar igualmente distribuída na fase líquida e excluída da fase sólida. A validade desta hipótese vai refletir-se nas taxas de recuperação do método. A forma física de misturar o solvente com o alimento e o tempo de contacto entre eles influencia a eficiência de extração (Serra, 2005; Soleymani *et al.*, 2012).

A separação da amostra é feita após a extração, e consiste na recuperação da parte líquida a fim de se isolar a micotoxina do extrato. Geralmente, a separação de extratos faz-se recorrendo a colunas de extração em fase sólida, como as IAC que isolam a OTA duma matriz aumentando a seletividade do método. O uso de colunas de imunoafinidade combinadas ou não com técnicas de extração de solventes é vulgarmente utilizada em análises a produtos alimentares. Quando se passa o extrato líquido pelas colunas, o analito é retido e as impurezas são lixiviadas. Para recuperar o analito fixo na coluna é utilizado um solvente ou mistura de solventes, dependendo do tipo de micotoxina em estudo (Serra, 2005; Prelle *et al.*, 2013).

Para a deteção de micotoxinas existem dois tipos de métodos, os de determinação rápida, sendo pouco rigorosos na quantificação, como no caso do método ELISA, disponíveis comercialmente para vários contaminantes e, os métodos de confirmação, que permitem conhecer de forma mais exata os níveis de micotoxina presentes, bem como confirmar a identidade do analito, sendo o caso dos métodos cromatográficos. A confirmação da identidade de analitos faz-se por comparação com o padrão. Em caso de dúvida ou numa situação ainda não descrita, a identidade do contaminante pode ser confirmada por recurso a processos de derivatização, que alteram as propriedades do analito, ou por análise do seu espectro (Serra, 2005).

Seguidamente serão descritas as técnicas utilizadas para determinação de ocratoxina A, assim como a aplicação das colunas de imunoafinidade, uma vez que são de grande importância para a captura da micotoxina e por terem sido empregues neste trabalho. O HPLC por ser o método mais utilizado para quantificação de OTA e ter sido a técnica utilizada neste estudo, será explicado todo o seu funcionamento no capítulo seguinte.

4.1 Colunas de imunoafinidade

O passo de purificação é uma das etapas mais relevantes na análise de micotoxinas, pois a pureza da amostra afeta a resolução de separação e a sensibilidade dos resultados obtidos (Costa, 2014).

As colunas de imunoafinidade são preparadas com anticorpos, específicos às toxinas em estudo, acoplados às partículas de gel, destacando-se pela sua simplicidade, alta especificidade e recuperação, que melhora os limites de deteção, baixa o valor percentual do

coeficiente de variação (CV) e possibilita a análise de múltiplos compostos em distintas matrizes. Os anticorpos usados podem ser monoclonais ou policlonais e são considerados como grupos funcionais ligados a um suporte sólido com características próprias e singulares. Os monoclonais são de pureza elevada e mais sensíveis às condições de ligação do que os anticorpos policlonais (Amado, 2002; Costa, 2014). Uma vantagem indiscutível está na utilização de soluções tampão que dispensam a aplicação de grandes volumes de solventes tóxicos durante a preparação de analitos. Já existem IAC que permitem a deteção de múltiplas micotoxinas, mas estas para além de serem escassas requerem extrações duplas, o que torna a análise mais demorada e pouco conveniente, pois requerem que uma grande quantidade de amostra diluída passe pela coluna. No entanto, as principais desvantagens na utilização deste material são os elevados custos envolvidos e o facto de a coluna só poder ser usada uma vez, devido à desnaturação dos anticorpos (Costa, 2014; Fujii *et al.*, 2004).

As colunas, utilizadas neste trabalho, contêm uma suspensão de gel de anticorpo monoclonal específico para a ocratoxina A. A utilização de um anticorpo monoclonal faz o teste altamente específico para a micotoxina alvo e proporciona uma melhor sensibilidade. Após a extração da toxina da amostra, o extrato é filtrado, diluído e passado lentamente através da coluna de imunoafinidade. Qualquer toxina que esteja presente na amostra é retida pelo anticorpo dentro da suspensão de gel, sendo a coluna lavada para remover o material não ligado. Posteriormente a micotoxina é libertada da coluna, ao ser eluída com um solvente que desnatura o anticorpo, sendo o eluato recolhido para posterior análise por HPLC ou LC-MS (Serra, 2005). Estas colunas apresentam um tempo de vida de 18 meses a 4°C (R-Biopharm Rhône Ltd., 2004). Na Figura 4.1 está exemplificado o funcionamento das colunas de imunoafinidade.

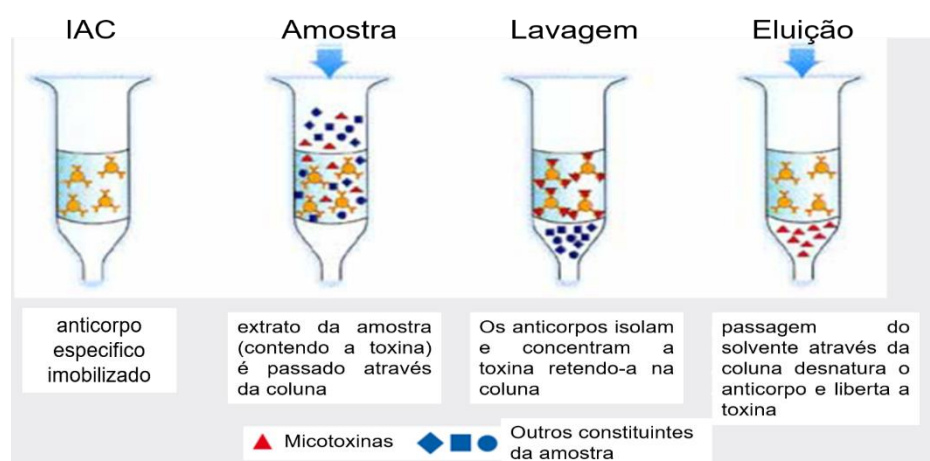


Figura 4.1 – Funcionamento das colunas de imunoafinidade (Adaptado de R-Biopharm Rhône Ltd., 2004)

Por vezes, interações não específicas entre os componentes da matriz e a suspensão de gel da coluna podem afetar o processo de purificação, mas em geral, as colunas de imunoafinidade são muito eficientes a remover impurezas. O resultado desta etapa é uma melhor limpeza e concentração da toxina a partir de amostras de géneros alimentícios, que dão

um cromatograma muito mais limpo, proporcionando uma deteção mais precisa e sensível (Serra, 2005).

4.2 Métodos cromatográficos

Atualmente, as técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa, acopladas ao detetor de espectrometria de massa são muito utilizadas na análise quantitativa de micotoxinas, enquanto que a seleção de amostras é frequentemente realizada pela cromatografia de camada fina. Os métodos cromatográficos podem separar um grande número de analitos, incluindo alguns com grandes diferenças na estrutura química (Pereira *et al.*, 2014).

A análise da ocratoxina A é tipicamente realizada recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, com diversas fases móveis, sendo compostas por metanol ou acetonitrilo acidificado e água (Ribeiro, 2007)

Quanto aos detetores, podem ser utilizados os de arranjo de díodos, de fluorescência ou de espectrometria de massa. Anteriormente, apenas os detetores de arranjo de díodos e de espectrometria de massa apresentavam uma base de dados que permitia confirmar a identidade do pico, através do tempo de retenção. Atualmente, detetores de fluorescência fornecem uma ferramenta adicional automatizada para a confirmação do pico e o controlo da sua pureza. Os espectros do detetor de arranjo de díodos são quase idênticos aos espectros de excitação de fluorescência, sendo as diferenças espectrais causadas pelas características específicas dos detetores, tais como a resolução espectral ou os tipos de lâmpadas. No entanto, para a deteção da OTA o detetor de fluorescência é a forma mais frequentemente reportada na literatura, seguida da deteção por espectrometria de massas (Cacique, 2012; Schuster & Schulenberg-Schell, 2000).

No método HPLC-FLD, a confirmação da identidade da micotoxina pode fazer-se por comparação do tempo de retenção do pico cromatográfico observado com o do padrão ou por derivatização do composto. As reações de derivatização podem ser usadas para confirmar a presença do analito, assim como para aumentar a sensibilidade do detetor e garantir a seletividade do método. No entanto, a forma mais comum de confirmar a identidade é através da observação do padrão, por ser mais rápido e simples. Se a resposta do detetor aumentar proporcionalmente à quantidade de padrão adicionado é provável que o metabolito em questão seja o mesmo do padrão. Pelo contrário, se surgem dois picos cromatográficos distintos, então trata-se de metabolitos diferentes (Cacique, 2012; Nollet, 2000; Rosseto & Delai, 2013; Uekane *et al.*, 2010).

A junção de HPLC com o sistema de deteção por espectrometria de massa é usada para a determinação de OTA, pois combina a alta resolução na separação cromatográfica com uma grande sensibilidade e especificidade do espectrómetro de massa, permitindo a confirmação e elucidação estrutural da OTA, a fim de minimizar falsos positivos. O ponto de partida para uma análise por espectrometria de massa passa pela formação de iões gasosos do

analito, sendo este método ditado pelo processo de ionização. Existem múltiplas técnicas de ionização utilizadas na espectrometria de massa, como por exemplo a ionização química, impacto eletrónico, ionização por eletronebulização (ESI) e ionização por termonebulização. Em que a técnica de ESI foi extensamente estudada para deteção de OTA em alimentos, por ser uma excelente ferramenta para esclarecimento estrutural e para quantificação de níveis residuais dessa micotoxina (Faria, 2012; Uekane *et al.*, 2010). A alta sensibilidade apresentada por esse tipo de detetor não é necessária para a maioria das matrizes, no entanto devido à ampla ocorrência de OTA e de uma legislação rígida para a sua presença no café torrado, torna necessário a disponibilidade de métodos validados cada vez mais sensíveis e capazes de identificar níveis vestigiais de micotoxina em matrizes complexas como o café. Desta forma a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa, com diferentes formas de ionização, vem adquirindo destaque, sendo essencial fazer mais estudos relativamente ao desenvolvimento, otimização e validação de método para análise de OTA no café torrado. Todavia esta combinação acaba por ser um processo demorado, por requerer equipamento muito caro e a necessidade de uma elevada manutenção assim como pessoal treinado e qualificado. Todos estes fatores são responsáveis por tornar o método inadequado para análises de rotina na indústria alimentar (Alcaide & Aguilar, 2013; Uekane *et al.*, 2010).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa pode ser utilizada com sucesso para a confirmação da presença de OTA em amostras por quantificar simultaneamente vários contaminantes. Geralmente este método é pouco empregue em análises de rotina, uma vez que consome muito tempo, devido à etapa de derivatização, necessária para atingir a volatilidade dos analitos (Pereira *et al.*, 2014; Uekane *et al.*, 2010).

A cromatografia em camada fina tem sido aplicada devido à sua simplicidade, baixo custo e robustez, principalmente no café verde e torrado. Contudo possui uma baixa sensibilidade, uma vez que sofre influência dos interferentes da matriz (Uekane *et al.*, 2010).

4.3 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos são uma alternativa válida para a deteção de ocratoxina A, particularmente o imunoensaio enzimático, o teste ELISA. Este tipo de método é aplicável a vários produtos alimentares, e utilizam anticorpos específicos para isolar as micotoxinas presentes nas amostras (Alcaide & Aguilar, 2013; Amado, 2002; Rosseto & Delai, 2013).

A técnica ELISA é um método fundamentado no princípio da interação específica entre o anticorpo e o antígeno (micotoxina em estudo). O método divide-se em três etapas, sendo a primeira a reação entre o anticorpo primário e o antígeno, a segunda uma reação entre o anticorpo primário com o antígeno e o anticorpo secundário acoplado a uma enzima e a terceira uma reação de hidrólise enzimática que ocorre entre o complexo antígeno-enzima e o substrato, que vai alterar a cor ou fluorescência da solução (Amado, 2002; Duarte *et al.*, 2010; Rosseto & Delai, 2013).

Embora os métodos cromatográficos sejam mais precisos e sensíveis do que o teste ELISA, este é vantajoso devido à sua simplicidade, elevada especificidade, rapidez, custo reduzido, bem como ao elevado número de amostras que podem ser analisadas em simultâneo, contribuindo assim para a otimização da monitorização da qualidade dos alimentos. Além disso, requer uma preparação mínima da amostra e o equipamento não envolve solventes orgânicos (Alcaide & Aguilar, 2013; Rosseto & Delai, 2013). Nalguns estudos, apresentou uma sensibilidade comparável com a deteção por fluorescência, por ter as características mencionadas anteriormente, assim como o facto de ter potencial de automatização e a possibilidade de ser usado em campo. No entanto, esta técnica é suscetível a fatores físico-químicos, tais como o pH, a seletividade do anticorpo utilizado para o procedimento de purificação e as interferências da matriz. Podendo esta última ser minimizada pelas técnicas de preparação de amostras, como diluições (Pereira *et al.*, 2014; Uekane *et al.*, 2010).

Visto os anticorpos produzidos muitas vezes mostrarem reatividade cruzada com compostos semelhantes à ocratoxina A, podendo levar a falsos positivos, os resultados obtidos pelo ensaio imunológico enzimático requerem confirmação. A incerteza dos seus resultados é geralmente maior do que os procedimentos cromatográficos (Amado, 2002; EFSA, 2004; Rosseto & Delai, 2013).

5. Cromatografia líquida de alta eficiência

5.1 História

A palavra cromatografia tem origem dos termos gregos “*chroma*” e “*graphein*”, e ganhou importância como método de separação por volta de 1906, com o botânico Mikhail Semenovich Tswett, ao criar um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, que envolve a diferencial destes num sistema de distribuição heterogéneo bifásico, fase estacionária e fase móvel. O investigador conseguiu separar pigmentos de cloroplastos em folhas verdes de plantas, utilizando uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, ocorrendo a separação dos componentes em faixas coloridas, embora o processo não dependa da cor. Mikhail Tswett foi considerado o pai da cromatografia, devido à sua valiosa contribuição no desenvolvimento desta técnica (Nollet, 2000).

Até ao ano de 1930 a técnica cromatográfica foi praticamente ignorada, sendo redescoberta por Kuhn e Lederer que aperfeiçoaram a cromatografia em coluna. A técnica cromatográfica tem vindo a evoluir ao longo dos anos, depois de Tswett, diversos cientistas contribuíram para o avanço quer teórico quer prático da cromatografia. Na década de 40, Martin e Synge desenvolveram o modelo dos pratos teóricos, que indica a eficiência da separação e lançaram bases fundamentais sobre a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência, recebendo um prémio Nobel em 1952. No ano 1956, J. J. Van Deemter, desenvolveu o denominado modelo cinético, que permite descrever a separação cromatográfica como um processo dinâmico (Ferreira, 2013, Nogueira, 2006).

Até o ano de 1972 foram atribuídos doze prémios Nobel, provando que as técnicas cromatográficas desempenharam um papel importante e fundamental, tornando-se a técnica de separação mais importante do século XX (Nogueira, 2006).

No entanto, apenas a partir dos anos 70 se conseguiu uma evolução considerável da cromatografia líquida clássica. Foram desenvolvidas colunas cromatográficas com partículas menores, responsáveis por uma melhor eficiência, e bombas de alta pressão, para a eluição da fase móvel e para tornar o tempo de análise mais curto. O avanço foi gradual até atingir o nível de sofisticação atual e surgir a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). Passando assim a ser a técnica de separação mais usada, também devido à sua sensibilidade e à sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, assim como para muitos campos da ciência e para o público (Meyer, 2004; Skoog *et al.*, 2001).

5.2 Conceitos básicos

Ao procedermos a uma separação cromatográfica, por cromatografia líquida, obtém-se um cromatograma, ou seja, uma representação gráfica da separação por meio de picos

correspondentes a cada um dos componentes em estudo de uma amostra. Para que se possa avaliar qualitativamente a separação, é necessário definir termos como resolução, capacidade de retenção e seletividade, relativos à separação ou ao sistema cromatográfico (Chust, 1990).

Define-se resolução como a magnitude da separação, ou seja, é a capacidade da coluna em separar os picos no cromatograma. É expressa como a razão entre a distância de dois picos, no ponto máximo, pelo valor médio da largura de ambos os picos, na linha de base. Sendo esta uma grandeza adimensional (Chust, 1990; Kupiec, 2004). Na Figura 5.1 está exemplificado uma má separação dos picos 1 e 2, resultado de uma baixa resolução.

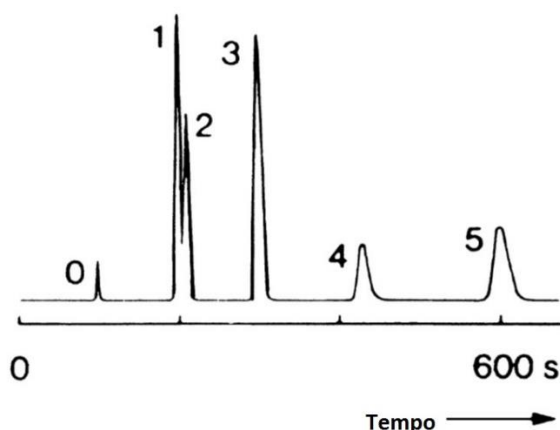


Figura 5.1 – Exemplo de um cromatograma (Adaptado de Meyer, 2004)

A capacidade de retenção é o termo universal utilizado para identificar ou localizar um pico, isto é, mede a capacidade de um sistema cromatográfico em reter os componentes da amostra. A seletividade está relacionada com a química envolvida na separação. Por outras palavras, este fator indica quando um pico elui relativamente a outro, estando diretamente relacionado com a capacidade do sistema em promover a separação (Chust, 1990).

Ao longo do tempo foram surgindo outros fatores para avaliar a capacidade de separação de uma coluna, como o fator de retenção e o número de pratos teóricos, ou eficiência da coluna (Picó, 2015).

O volume de retenção ou volume de eluição é a quantidade de fase móvel necessária para arrastar um soluto particular através da coluna. O tempo de retenção para cada componente é definido como o tempo necessário após a injeção da amostra na coluna até que o componente atinja o detetor. Quanto mais tempo um componente é retido pela coluna, maior será a sua capacidade em separar (Kupiec, 2004).

O número de pratos teóricos descreve a dispersão do pico cromatográfico em relação ao seu centro, constituindo ao mesmo tempo um método fácil para o controlo diário da eficiência do sistema. Se os picos não forem simétricos e apenas se aproximarem da forma gaussiana, o número de pratos teóricos será baixo. Sendo o seu cálculo um método excecional para o controlo do desgaste da coluna cromatográfica (Chust, 1990).

Resumindo a resolução de uma dada separação cromatográfica depende diretamente da capacidade de retenção dos componentes da amostra, da seletividade para a referida

separação e da eficiência da coluna cromatográfica. Alterações acentuadas nestes parâmetros experimentais, comparados com os valores obtidos quando a coluna é nova, indicam que a coluna cromatográfica se encontra degradada.

Outro conceito usado em cromatografia é o processo de eluição, que indica a passagem do eluente pela coluna. A eluição pode ser isocrática, ou seja, apresenta a mesma composição de fase móvel durante a eluição; ou por gradiente, quando há mudanças na sua composição durante o processo de separação. O método isocrático é a técnica mais simples e deve ser a primeira escolha quando se desenvolve uma separação. O método por gradiente, geralmente é utilizado na separação de misturas complexas (Kupiec, 2004).

Em HPLC, a temperatura também pode influenciar o processo de separação. Com o aumento da temperatura, o desempenho da coluna cromatográfica pode aumentar, devido à diminuição da viscosidade da fase móvel. Para a otimização de uma separação, a temperatura deve ser sempre controlada. A falta de controlo pode resultar numa baixa reprodutibilidade e/ou em picos de baixa resolução (Chust, 1990; Meyer, 2004).

5.3 Aplicação

O HPLC é usado em várias áreas da indústria como a agroalimentar, farmacêutica, química, entre outras, assim como em universidades e até em departamentos governamentais. É aplicada quer seja para o controlo de qualidade de rotina ou como uma potente ferramenta para a investigação pura e aplicada. O único requisito deste método é que a amostra seja solúvel na fase móvel (Ferreira, 2013).

5.4 O Sistema de HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica de grande impacto atual e com um vasto campo de aplicações. Tem como objetivo a separação de distintas espécies químicas presentes numa amostra. A separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas da amostra e duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro rígido com o interior recheado por pequenas partículas. A fase móvel neste método cromatográfico é líquida, daí o nome desta técnica. Na cromatografia líquida clássica, os componentes da amostra são arrastados pela fase móvel através da coluna apenas pela força da gravidade, em HPLC por serem utilizadas partículas menores no enchimento da coluna é necessário o uso de uma bomba de alta pressão para que a separação decorra num espaço de tempo mais curto (Degani *et al.*, 1998; Lattanzio *et al.*, 2014). Os componentes básicos de um instrumento de HPLC são um injetor, uma bomba de alta pressão, uma coluna cromatográfica, um detetor e um computador (processador de dados) (Meyer, 2004; Peres, 2002). Na Figura 5.2 estão exemplificados os componentes essenciais para o funcionamento do HPLC.

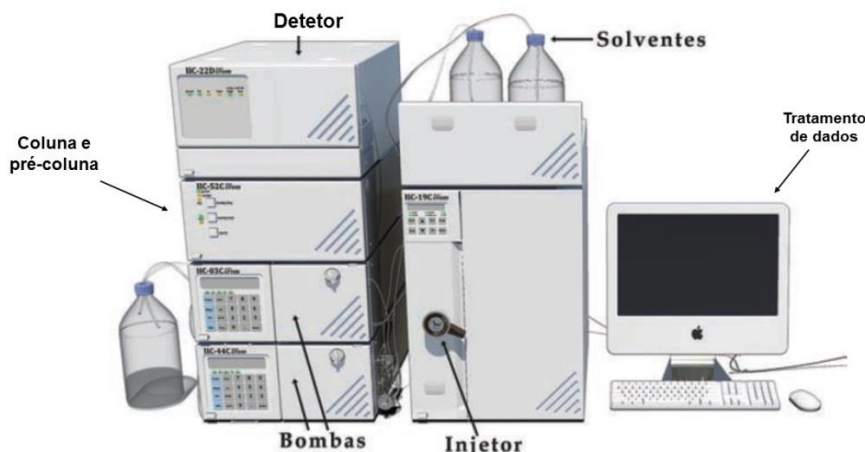


Figura 5.2 – Exemplo dos principais componentes de HPLC (Adaptado de Lanças, 2009)

5.4.1 Injetor

Na cromatografia líquida clássica há um fator limitante na precisão das medições, uma vez que a reprodutibilidade com que se introduz a amostra na coluna é baixa, pois esta depende da competência do operador (Hanai, 1999; Skoog *et al.*, 2001). O volume de injeção máximo pode ser controlado mediante um *loop* (capilar de amostragem) na válvula de injeção (Ferreira, 2013; Meyer, 2004).

Uma válvula de injeção típica é uma válvula de seis portas, que possui duas posições: a posição de carga e a posição de injeção. Para introduzir a amostra, a válvula é colocada na posição de carga, onde a fase móvel ultrapassa o *loop* de amostra e flui diretamente a partir da bomba através da válvula para a coluna. Para introduzir a amostra no cromatógrafo, a válvula passa para a posição de injeção e a fase móvel é utilizada para impulsionar a amostra para a coluna (Skoog *et al.*, 2001).

Uma das evoluções do método de cromatografia de alta eficiência foi a introdução de injetores automáticos, que permitem uma elevada reprodutibilidade e que resistem a altas pressões, conseguindo-se assim melhores resultados na análise quantitativa (Chust, 1990; Kupiec, 2004; Skoog *et al.*, 2001). Os injetores automáticos contêm uma versão acionada mecanicamente da válvula de seis portas encontrada em injetores manuais, o funcionamento é semelhante ao dos manuais, mas a amostra é introduzida para uns *vials* que são posteriormente colocados no injetor automático (Ferreira, 2013).

5.4.2 Bomba

No HPLC as bombas utilizadas são de alta pressão, devendo ser possível controlar a sua pressão máxima. O facto de a fase móvel ser um líquido com alguma viscosidade, torna-se necessário ser pressionada para permitir vencer a resistência exercida pelas pequenas partículas da coluna cromatográfica. As pequenas partículas têm caminhos de difusão curtos e,

portanto, produzem um elevado número de pratos teóricos por unidade de comprimento (Meyer, 2004).

A bomba é um dos principais componentes do cromatógrafo, pois dela dependem uma variedade de fatores. O seu desempenho depende muito do comportamento do fluxo da fase móvel e da forma como ela minimiza o ruído de fundo no detetor (Chust, 1990).

A variação do fluxo resulta na alteração dos tempos de retenção e das áreas dos picos, daí a necessidade do fluxo ser constante, isento de pulsações e ter a possibilidade de ser ajustado conforme o procedimento utilizado para a determinação de analitos, devendo utilizar-se baixos fluxos de modo a permitir uma boa reprodutibilidade e precisão. A gama de fluxo pode variar de 0,1 mL/min a 10,0 mL/min (Chust, 1990; Degani *et al.*, 1998). Atualmente, as bombas são compostas por êmbolos com válvulas que regulam o fluxo com uma maior precisão. Existindo dois tipos com estas características: as pneumáticas e as mecânicas, capazes de controlar a pressão e manter o fluxo constante, respetivamente (Meyer, 2004).

As bombas pneumáticas utilizam-se quando são aplicadas pressões acima de 500 bar. Neste tipo de bomba, um gás exerce uma pressão, ativando a maior área de secção transversal do pistão e a outra extremidade encontra-se em contacto com o eluente sobre uma área muito menor. A força é a mesma dos dois lados do pistão, mas a pressão é maior na área menor, de acordo com a proporção das duas áreas (Ferreira, 2013; Meyer, 2004).

As bombas mecânicas podem ser subdivididas em bombas de pistão recíprocas e bombas tipo seringa. As bombas de pistão recíprocas são o tipo mais comum de bombas em HPLC. A fase móvel é bombeada pelo deslocamento de um pistão controlado por um motor, enquanto as válvulas abrem ou fecham, o líquido segue na direção apropriada. As bombas do tipo seringa são formadas por um pistão que se move por ação de um mecanismo de rosca, sustentado por um motor, o fluxo é contínuo e sem pulsações, porém têm capacidade total limitada, sendo necessário parar o enchimento após o fornecimento de uma quantidade relativamente baixa de solvente (Ferreira, 2013).

5.4.3 Coluna cromatográfica

O processo de separação das substâncias que compõem a amostra ocorre na coluna cromatográfica, também conhecida como fase estacionária, sendo outro dos constituintes importante e crítico do sistema cromatográfico. A maioria das colunas de HPLC são feitas de aço inoxidável, resistentes à pressão, inertes à corrosão química e reaproveitáveis, não sendo necessária a sua regeneração após cada separação. A escolha de uma coluna depende de variados fatores, como as características da amostra em estudo. A amostra pode ser definida de várias formas como se pode observar na Figura 5.3, conforme essas características, poder-se-á escolher o mecanismo de separação que melhor se lhe adapte (Chust, 1990; Meyer, 2004).

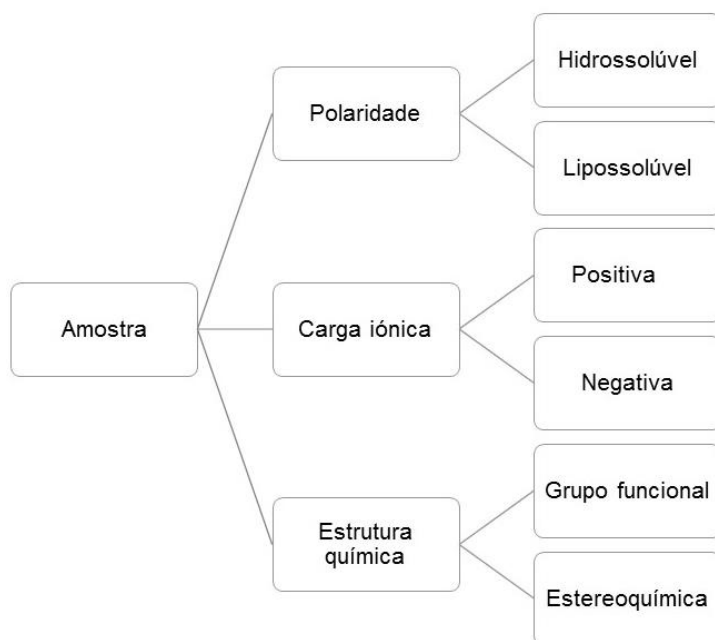


Figura 5.3 – Propriedades físico-químicas da amostra (Adaptado de Chust, 1990)

Os componentes presentes na amostra, devido às suas distintas propriedades, dispõem de distintos graus de “afinidade” com as fases móvel e estacionária e por conseguinte as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Pode-se então concluir que o componente com maior “ligação” à coluna é aquele que elui por último e, pelo contrário, o componente que elui em primeiro lugar será o que apresenta uma menor “ligação” com o enchimento (Lattanzio *et al.*, 2014).

Além disso, numa coluna cromatográfica há a considerar também dois tipos de fatores que a caracterizam, fatores químicos, que dizem respeito ao seu material de suporte e fatores mecânicos, que dizem respeito ao invólucro (Chust, 1990). O comprimento da coluna afeta tanto a eficiência como a velocidade da separação. A utilização de colunas mais compridas resulta em tempos de análise superiores, porém a eficiência da coluna tende a aumentar. As colunas analíticas podem variar de 30 a 300 mm de comprimento. A seletividade, capacidade e eficiência da coluna são afetados essencialmente pelo material de suporte da coluna. Os enchimentos mais comuns em HPLC são micropartículas de vários tamanhos, formas e porosidades. O tamanho dos poros dita a superfície com a qual a amostra interage. Para um bom funcionamento das colunas, as suas partículas devem ser pequenas e esféricas, o que vai levar a um aumento da sua eficiência, uma elevada área superficial e uma maior retenção, devendo ser resistentes às altas pressões utilizadas em HPLC e quimicamente inertes em todas as condições de pH e natureza do eluente (Meyer, 2004; Peres, 2002).

A fase estacionária possui dois conceitos. Se ela for mais polar, ou seja mais solúvel em água (hidrofílica), que a fase móvel é chamada de fase normal, utilizando-se maioritariamente como material de suporte a sílica e a alumina. No caso da fase estacionária ser mais apolar (hidrofóbica) que a fase móvel dá-se-lhe o nome de fase reversa. Sendo esta última a mais utilizada em HPLC, representando 75 % de aplicações, devido aos compostos

analisados serem maioritariamente polares e a adsorção ser mais homogénea. A separação é, essencialmente, uma operação de extração e é útil para separar componentes não-voláteis. O tipo de colunas conhecidas como C8 e C18 (sílica octadecil) são responsáveis pela maioria das separações em fase reversa, além disso o tempo de retenção aumenta à medida que o número de átomos de carbono aumenta, uma vez que aumenta a área de contato entre a molécula da amostra e a fase estacionária. Os eluentes mais usados são a água, o metanol e o acetonitrilo (Degali *et al.* 1998; Meyer, 2004).

Não esquecer que a fase móvel em HPLC deve ter um alto grau de pureza, para que se possa fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem interferir na deteção do analito. A fase móvel deve ser compatível com o detetor utilizado, possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra e não degradar a fase estacionária. Sendo recomendado o uso de solventes de grau HPLC (Chust, 1990; Peres, 2002).

Uma forma de diminuir a contaminação do equipamento por impurezas é a desgaseificação da fase móvel, pois garante reprodutibilidade da vazão, ao retirar o ar dissolvido na fase móvel e evita bolhas na bomba, que mantem a linha de base estável. Um dos métodos de desgaseificação é o ultrassom. Outra maneira de impedir a contaminação da coluna por impurezas é a adição de uma coluna antes desta, chamada de pré-coluna. Contém o mesmo enchimento da fase estacionária embora de menor tamanho, evitando alterações do seu desempenho e aumentando o seu tempo de vida. A pré-coluna serve de proteção entre o injetor e a coluna e também funciona como saturador da fase móvel impedindo assim o seu arrastamento na coluna (Chust, 1990; Kupiec, 2004; Skoog *et al.*, 2001).

5.4.4 Detetores

Atualmente existe uma vasta gama de detetores para HPLC e têm como função identificar a presença do analito de interesse que está a ser eluído da coluna cromatográfica, gerando um sinal eletrónico na forma de um pico cromatográfico (Kupiec, 2004). A sensibilidade destes é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera esse sinal (Peres, 2002).

As características desejáveis para um detetor de HPLC são: ter uma alta sensibilidade, baixo limite de deteção, uma ampla faixa de linearidade, ser confiável e reprodutível, de fácil operação, que não destrua o soluto, seja insensível a mudanças na fase móvel e à temperatura e com um baixo nível de ruído. Não existe um que exiba todas estas propriedades, mas apresentam uma ampla faixa de aplicações. A escolha de qualquer um deles dependerá essencialmente das características químicas ou estruturais das espécies a detetar, e da forma como estas interagem com o eluente (Chust, 1990; Peres, 2002).

Abaixo seguem os detetores mais utilizados em HPLC.

- Ultravioleta - Visível (UV-Vis) e de díodos: São chamados de detetores fotométricos pois baseiam-se na absorvância do UV-VIS e representam 70 % das análises em

HPLC publicadas. Apresentam um menor custo, são praticamente insensíveis a pequenas variações de fluxo e de temperatura e são totalmente compatíveis com gradientes de solventes. Têm como única desvantagem a sua seletividade, por não poderem ser utilizados na detecção de lípidos, hidrocarbonetos lineares, hidratos de carbono, ácidos gordos e da maior parte dos polímeros. Relativamente aos de díodos, estes permitem uma riqueza de informação obtida a partir de vários espectros de UV. Para a identificação dos espectros, estes podem ser comparados com uma biblioteca. Ao serem conhecidos os espectros dos compostos em causa é possível a detecção dos comprimentos de onda, levando a uma quantificação precisa de um composto (Chust, 1990; Nolet, 2000; Skoog *et al.*, 2001).

- **Fluorescência (FLD):** São utilizados como método de detecção específica, por serem sensíveis para substâncias que têm fluorescência natural (Peres, 2002). São os detetores que exibem uma maior sensibilidade, até 1000 vezes superior à do detetor UV, possuem todas as vantagens dos detetores UV-VIS e ainda apresentam uma especificidade que permite discriminar os constituintes de interesse numa matriz complexa de substâncias não fluorescentes. São constituídos por uma lâmpada de excitação, seguida de um filtro de excitação ou de uma rede de difração. Um feixe luminoso incide sobre a célula da amostra excitando a mesma, que vai originar a emissão de um feixe de luz ao retornar ao estado fundamental. Esse feixe de luz é dirigido para um segundo filtro, que seleciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir por último no fotodetetor. A principal desvantagem deste tipo de detetor é o seu custo, podendo chegar a ser até 4 vezes superior ao de um detetor UV-VIS. Quanto a aplicações, estas dirigem-se com maior incidência na análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's), esteroides, vitaminas e corantes alimentares (Chust, 1990; Meyer, 2004).

- **Índice de refração:** são detetores universais e por conseguinte apresentam resposta para qualquer tipo de amostra. Estes acompanham continuamente a diferença do índice de refração entre a fase móvel e o eluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra (Peres, 2002). São compostos por uma lâmpada de emissão, que incide o seu feixe luminoso sobre uma célula dupla, um espelho e um fotodetetor. Quando ambas as células estão equilibradas, cheias apenas com a fase móvel, a luz que as atravessa não sofre qualquer tipo de deflexão, incidindo na sua totalidade sobre o espelho e refletindo no fotodetetor. No entanto, quando na célula da amostra passa um componente da amostra, a luz sofre um desvio, incidindo em menor intensidade no espelho e consequentemente no fotodetetor. A refração é tanto maior quanto maior for a concentração da substância a quantificar. A desvantagem que apresenta este tipo de detetores é a sua alta sensibilidade a variações de fluxo e temperatura, sendo também, incompatível com gradientes de solventes. É usual a utilização de um pequeno forno para a célula de detecção, o que aumenta o seu custo. Os seus principais campos de aplicação são a análise de hidratos de carbono, polissacáridos, lípidos, ácidos gordos livres e polímeros em geral (Chust, 1990; Skoog *et al.*, 2001).

- **Condutividade:** O detetor de condutividade eletrolítica apresenta uma alta sensibilidade e seletividade. O seu princípio de funcionamento consiste na medida da

condutividade total da solução por meio de uma célula tubular com dois, quatro ou mesmo seis eletrodos, que gera um sinal que será posteriormente tratado e quantificado. Estes detetores embora apresentem uma alta sensibilidade são extremamente sensíveis a mudanças de temperatura. Devido a este fator e também à alta condutividade do eluente, é necessário recorrer a processos de compensação e supressão eletrónica ou química. Os principais campos de aplicação são a análise de aniões, cationes e metais de transição (Chust, 1990).

- **Eletroquímico:** Este tipo de detetor tem conhecido uma larga expansão devido à sua grande sensibilidade na deteção de amins biogénicas. O seu princípio de deteção consiste na oxidação ou redução da substância a analisar na superfície do eletrodo. O ganho ou perda de eletrões resultante da redução ou oxidação da substância produz uma corrente proporcional à concentração da mesma ao passar na célula de deteção. Os campos de aplicação deste tipo de detetor são a análise de amins biogénicas e de alguns iões de difícil deteção pelo detetor de condutividade (Nollet, 2000; Skoog *et al.*, 2001).

- **Espectrometria de massa (MS):** Estes detetores são muito sensíveis, seletivos e multiplicam os eletrões que determinam a intensidade do feixe de iões. Para permitir a deteção por espectrometria de massa de ionização de chama o solvente deve ser evaporado. Produz uma “impressão digital” dos analitos em estudo (Hanai, 1999; Meyer, 2004).

A junção do HPLC com os detetores anteriormente mencionados melhorou a capacidade para separar e identificar várias substâncias dentro de uma mistura. Pois permitem a separação cromatográfica dos constituintes da amostra seguida da identificação dos picos através do detetor (Kupiec, 2004).

5.4.5 Processador de dados

Para armazenar e analisar os dados cromatográficos, frequentemente, é utilizado um computador. É utilizado não só para controlar todos os elementos que compõem o HPLC, como também para converter o sinal do detetor em cromatograma. Através do cromatograma é possível obter o tempo de retenção dos componentes da amostra, para identificar a substância, e a área do pico, para posteriormente se obter a concentração desta na amostra analisada. (Ferreira, 2013; Kupiec, 2004). Na Figura 5.4 está exposto o processo de receção do sinal do detetor pelo processador de dados.



Figura 5.4 – Processo de receção do sinal do detetor (Adaptado de Harris, 2011)

5.5 Mecanismo de separação cromatográfica

A separação cromatográfica é obtida a partir de interações, físicas e químicas, diferenciadas entre os componentes da amostra e as fases estacionária e móvel. Com esta abordagem a cromatografia líquida pode ser subdividida em cinco mecanismos de separação: adsorção, partição, de permuta iónica, por exclusão de tamanho e afinidade (Chust, 1990; Meyer, 2004).

A cromatografia de adsorção foi a forma clássica de cromatografia líquida que desenvolveu Tswee (Skoog *et al.*, 2001). O seu processo de separação é baseado nas diferenças de afinidade dos componentes da amostra pelo enchimento da fase estacionária. Ou seja, os elementos mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel. Pelo contrário, os constituintes que se ligam mais fracamente à fase estacionária circulam mais rapidamente. Resultando na separação dos componentes da amostra, em bandas ou zonas discretas, que poderão ser analisados qualitativa e/ou quantitativamente (Silva, 2012; Meyer, 2004). Este mecanismo pode ser de fase normal ou reversa, sendo que o material da fase estacionária deve apresentar uma área superficial específica elevada, uma vez que a retenção da amostra é diretamente proporcional à área superficial (Meyer, 2004).

A cromatografia de partição é baseada nas diferenças de solubilidade dos componentes na fase estacionária e na fase móvel. Visto, neste caso, a fase estacionária ter de ser líquida e por apresentar um comportamento instável, foi desenvolvida uma fase estacionária composta por colunas de cadeia longa (C18) ligadas em fase, uma vez que se considera terem um comportamento semelhante a um líquido. Assim o processo é denominado partição quando o soluto é transferido de uma fase para outra (Ferreira, 2013; Harris, 2011; Meyer, 2004).

Na cromatografia de permuta iónica a fase estacionária é composta por uma superfície carregada ionicamente, e o que vai provocar o processo de separação vão ser os diferentes comportamentos entre os componentes iónicos da amostra e os iões da fase estacionária. A afinidade entre eles pode ser controlada por alteração do pH e da força iónica do eluente. Sendo que, quanto maior a carga de um componente, mais forte será a atração para com a coluna, levando assim mais tempo a ser eluído da coluna. Esta técnica é apropriada para a separação de aminoácidos, produtos metabólicos iónicos e orgânicos, entre outros (Kupiec, 2004; Meyer, 2004).

A cromatografia por exclusão de tamanho, também denominada de permeação em gel (GPC) e filtração em gel (GFC), é utilizada especialmente em espécies de elevado peso molecular (Harris, 2011; Skoog *et al.*, 2001). Uma vez que separa os componentes da amostra segundo o tamanho efetivo das moléculas, isto é, as moléculas que forem maior que as partículas porosas da coluna não são retidas, sendo as primeiras a serem eluídas. Para moléculas pequenas, a diferença do peso molecular tem de ser superior a 10 % para a resolução ser aceitável, relativamente às macromoléculas é necessária uma diferença de duas

vezes o peso molecular. O mecanismo de GPC usa solventes orgânicos e é utilizada para isolar compostos de baixo peso molecular de amostras que contenham compostos com elevados pesos moleculares como óleos ou gorduras, pelo contrário a GFC, apresenta fases móvel aquosa e colunas hidrofílicas, é usada para separar e identificar macromoléculas biológicas (Chust, 1990; Ferreira, 2013; Skoog *et al.*, 2001).

No caso da cromatografia de afinidade as interações bioquímicas altamente específicas fornecem os meios de separação. Ocorre uma ligação molecular específica e reversível entre o soluto e um ligante imobilizado na fase estacionária, ou seja, este processo é baseado na capacidade das macromoléculas biológicas reconhecerem e ligarem-se a outras moléculas. Esta técnica pode ser usada para separar produtos biológicos, como ligações entre enzimas e substratos, anticorpos e antigénios, a partir de misturas complexas sem envolver um custo elevado (Harris, 2011; Meyer, 2004).

5.6 Possíveis problemas e limitações

O HPLC apesar de ser um ótimo equipamento para a separação dos constituintes em estudo de uma amostra, podemos nos deparar com algumas dificuldades, como por exemplo, uma má resolução dos picos, picos distorcidos, baixa retenção dos compostos, o tempo de análise ser muito demorado ou limite de deteção reduzido. Podendo estes problemas serem ultrapassados com a utilização de ferramentas adequadas, com o controlo de alguns fatores e com um operador experiente. Para além disso o equipamento apresenta um alto custo, tanto na sua aquisição como na sua manutenção, sendo também responsável o detetor, uma vez que não existe um ideal há a necessidade de variar de detetor dependendo do tipo de composto que se queira estudar. Contudo, as principais vantagens da sua aquisição é de ser um bom equipamento para uma análise quantitativa, ser versátil, automático e de se poder utilizar vários dos seus componentes, como a fase estacionária, várias vezes (Harris, 2011).

6. Validação de métodos analíticos

Um método de pesquisa é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros, sistemáticos e/ou aleatórios, podendo alterar de forma significativa o resultado final, ainda mais se o número de analistas a realizar o ensaio for elevado (RELACRE, 2000; Ribeiro, 2008). Tendo em conta que um dos principais requisitos, para processos que envolvam análises químicas, é a obtenção de dados de qualidade que alcancem os objetivos propostos, recorre-se ao processo de validação de métodos analíticos. Uma vez que, quando cumprido este processo é demonstrado que o método é adequado para a quantificação do analito pretendido, a uma determinada gama de trabalho e com uma exatidão e precisão satisfatórias. O processo de validação garante também a qualidade operacional e analítica pretendida, assim como as características necessárias para a obtenção de resultados creíveis, sendo este o primeiro passo do Sistema de Qualidade Laboratorial (Almeida, 2012; RELACRE, 2000).

As etapas seguintes do Sistema são o controlo de qualidade interno, os ensaios interlaboratoriais e ainda a acreditação do procedimento analítico validado (MAPA/ACS, 2011). Os processos de validação implementados por laboratórios químicos em Portugal devem ter em consideração as condições indicadas no Guia RELACRE. A IPAC – Instituto português de acreditação também redigiu um guia para orientar laboratórios sobre a implementação dos requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025, que exhibe um item referente à validação de métodos analíticos.

A primeira etapa para o processo de validação é a descrição e caracterização detalhada de todos os passos do estudo experimental, de modo a que qualquer pessoa com a devida preparação possa executar a análise. Para além disso, nos documentos que permanecerão no laboratório também é necessário colocar o título do método, o código de identificação, a sua revisão, a data de entrada em vigor da análise, os responsáveis pela elaboração e aprovação do ensaio e o número de cada página (RELACRE, 2000).

Segundo o Guia RELACRE os requisitos mínimos necessários para o processo de validação são a curva de calibração (gama de trabalho e linearidade), os limiares analíticos (detecção e quantificação), a sensibilidade, a precisão e a exatidão. Mas, estes podem variar dependendo do tipo de método, ou seja, para uma análise qualitativa não há necessidade de testar e validar, a linearidade do método, o limite de quantificação, a precisão e a exatidão, sendo os restantes parâmetros e a robustez os pontos mais importantes na validação. Pelo contrário uma análise quantitativa aplicada a analitos, em teores vestigiais, todos os requisitos acima citados são importantes (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004).

6.1. Curva de Calibração

A curva de calibração é um parâmetro muito importante para um método quantitativo, uma vez que indica a relação entre o sinal do equipamento e a concentração conhecida do

analito, neste caso a ocratoxina A. Utilizando o método dos mínimos quadrados, a variável dependente (y) representa sempre a resposta instrumental do equipamento, no caso de se tratar de um método cromatográfico, y será a área do pico, e a variável independente (x) representa sempre as concentrações dos padrões. Assim, quando a curva de calibração representa uma função polinomial de primeiro grau, isto é, uma reta, pressupõe-se que existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta (RELACRE, 2000).

Este parâmetro deve ser avaliado no início da análise, de modo a verificar se os critérios de aceitação (linearidade e estabilidade entre calibrações) são respeitados para se dar seguimento à análise. Para a curva de calibração são recomendados dez pontos de concentração conhecida do analito (padrão), não devendo ser nunca um número inferior a cinco, distribuindo-se equitativamente pela gama de trabalho (MAPA/ACS, 2011; RELACRE, 2000). Esses pontos devem fazer-se acompanhar do branco, constituído por todos os reagentes com a exceção do analito a analisar, pois caso este gere um sinal diferente de zero irá anular o efeito de interferências na amostra (INMETRO, 2007).

6.1.1 Gama de trabalho

O intervalo de trabalho corresponde à faixa de concentrações utilizada para avaliar a precisão e exatidão do método (Brito *et al.*, 2005). Para se escolher a gama de trabalho deve ter-se em conta os valores legislados do analito em estudo, assim como os valores dos limites de deteção e quantificação para o extremo inferior da curva, assim como o sistema de deteção do instrumento para o extremo superior (INMETRO, 2007; RELACRE, 2000).

Quando se utiliza uma metodologia que envolve a realização de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias, analisando 10 vezes o primeiro e o último padrão, uma vez que compara estatisticamente a variância do padrão (S^2) mais concentrado com o menos concentrado da curva. Segundo o Guia RELACRE, para se calcular as variâncias associadas ao primeiro e último padrão utilizam-se as equações (6.1) e (6.2).

$$S^2_i = \frac{\sum_{i=1}^{10} (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-1} \quad (6.1)$$

Sendo,

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{10} y_i}{n} \quad (6.2)$$

Em que i é o padrão, y_i são os valores do sinal instrumental e \bar{y} a média aritmética dos valores do sinal instrumental.

As variâncias calculadas são posteriormente avaliadas para se verificar se existem diferenças significativas entre elas. Para isso é calculado o valor experimental (PG) segundo a expressão matemática (6.3), que é depois comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher, para $n - 1$ graus de liberdade, com um intervalo de confiança de 99 %.

$$PG = \frac{S_i^2}{S_j^2} \quad (6.3)$$

Sendo que S_i^2 deverá ser o maior valor de variância calculada e S_j^2 o menor.

Se o valor de PG for \leq ao valor de F tabelado, a diferença de variâncias não é significativa, sendo a gama de trabalho ajustada. Pelo contrário, se o valor de PG for superior, a diferença entre as variâncias é significativa. Logo a gama de trabalho deverá ser ajustada até que as variâncias do primeiro e último padrão não sejam estatisticamente diferentes.

Para verificar se o sistema cromatográfico é adequado para o método a validar é calculado o coeficiente de variação (CV %), através da equação (6.4).

$$CV (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (6.4)$$

Em que \bar{x} representa a média das medições e s o desvio padrão, sendo este último determinado pela expressão matemática (6.5).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6.5)$$

Onde, x_i representa os valores das áreas dos picos e dos tempos de retenção e n o número total de medições.

6.1.2 Linearidade

Num método analítico que usa a curva de calibração, a linearidade refere-se à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, enquadrados num intervalo analítico específico (Brito *et al.*, 2005). Este parâmetro pode ser avaliado por inspeção visual do gráfico através da reta de calibração e do valor do coeficiente de correlação linear obtido, devendo este último ser superior a 0,995, e por avaliação estatística através do teste de RIKILT que analisa a linearidade de cada ponto da curva de calibração (Henriques, 2008; MAPA/ACS, 2011; Ribeiro, 2008).

Para a avaliação estatística, primeiramente, é determinada a razão entre o sinal instrumental (y_i) e a concentração do padrão (x_i) para cada ponto da reta e a média das razões obtidas $(y_i/x_i)_m$. De seguida é calculada a percentagem de linearidade para cada ponto utilizando a equação (6.6).

$$\frac{(y_i/x_i)}{(y_i/x_i)_m} \times 100 \% \quad (6.6)$$

Para admitir a linearidade do método, considera-se o valor da média como sendo 100 %, indicando uma linearidade perfeita, devendo cada ponto da reta de calibração estar situado entre os 90 % e 110 % (100 ± 10 %). Caso existam valores que se encontrem fora deste intervalo, esses valores devem ser rejeitados e o teste de RIKILT deverá ser novamente aplicado à gama reduzida, até que se verifiquem os requisitos estabelecidos (Henriques, 2008).

6.2 Limiares analíticos

A determinação dos limiares analíticos é relevante quando se trabalha com uma faixa de concentrações relativamente baixa (Marques, 2007). Os limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) são parâmetros importantes pois indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar o analito em análise, respetivamente, com uma determinada precisão e exatidão (Ferreira, 2013; RELACRE, 2000).

Quando se trata de um método analítico que envolve a utilização de uma curva de calibração linear, os limites de deteção e quantificação são calculados através do declive da reta e do desvio padrão residual ($S_{y/x}$) (Ferreira, 2013).

6.2.1 Limite de deteção

O limite de deteção é o parâmetro para o qual existe uma maior variedade de formulações, no entanto todas as organizações oficiais o consideram como sendo a menor quantidade de analito que pode ser detetado na amostra em estudo, não sendo necessariamente quantificado como um valor exato (Brito *et al.*, 2005; Ribeiro, 2008; Taverniers *et al.*, 2004). De salientar, que uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa é inferior a um determinado valor (RELACRE, 2000).

Para uma correta definição deste parâmetro é necessário introduzir dois conceitos de estatística: erro do tipo I e do tipo II. Sendo, o erro do tipo I (risco α) a probabilidade de concluir a presença do componente em análise, quando de facto não existe na amostra e o erro do tipo II (risco β) é a probabilidade de concluir a ausência do analito em estudo, quando de facto ele existe. De forma a analisar corretamente os limiares analíticos, estes dois erros devem ser minimizados, usando-se as recomendações da IUPAC $\alpha = \beta = 5\%$ (Ferreira, 2013; RELACRE, 2000).

Para um método que utiliza a calibração linear, a forma utilizada para calcular o limite de deteção baseia-se na equação (6.7),

$$LD = \frac{(3,3 \times S_{y/x})}{b} \quad (6.7)$$

Sendo,

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N-2}} \quad (6.8)$$

Em que, **b** é o declive da reta de calibração, **$S_{y/x}$** o desvio padrão residual da curva de calibração e **3,3** é o valor de K, um fator numérico para um nível de confiança de 99,7 %, sendo que, quanto maior este valor maior é o nível de confiança. Na equação (6.8) temos **y_i** que é substituído pelos valores do sinal analítico, **x_i** pela concentração dos padrões, **a** que é a ordenada na origem da curva de calibração e **N** o número de padrões utilizados (RELACRE, 2000; Taverniers *et al.*, 2004).

6.2.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação de um procedimento analítico é definido como a menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, sob as condições experimentais adotadas (Brito *et al.*, 2005; RELACRE, 2000; Ribeiro, 2008), sendo o valor deste sempre superior ao de deteção. No entanto, não é impossível quantificar um valor abaixo do limite de quantificação, apenas se considera pouco fiável assim como a sua incerteza, associada a concentrações muito baixas, ser superior ao próprio valor medido (Taverniers *et al.*, 2004).

Na prática quando se trata de um método que emprega a calibração linear, este parâmetro é determinado por uma equação semelhante á utilizada para determinar o limite de deteção acima, embora o valor de K seja igual a 10, o que significa que o desvio padrão relativo (RSD %) ou coeficiente de variação é de 10 % (RELACRE, 2000; Taverniers *et al.*, 2004).

$$LQ = \frac{(10 \times S_{y/x})}{b} \quad (6.9)$$

6.3 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método em distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Ou seja, quando a curva de calibração for um modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da mesma (RELACRE, 2000).

6.4 Precisão

A precisão representa o grau de concordância de resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, em condições definidas (RELACRE, 2000; Taverniers *et al.*, 2004). Existem várias formas para avaliar este parâmetro, sendo principalmente utilizadas a repetibilidade e precisão intermédia. São geralmente expressas pelo desvio padrão e pelo coeficiente de variação (Figueiredo, 2012; INMETRO, 2007).

6.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de resultados obtidos por medições repetidas efetuadas sobre uma mesma amostra, sob as mesmas condições, tais como: a utilização do mesmo laboratório, analista, equipamento, os mesmos reagentes e curtos intervalos de tempo (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004).

Define-se o limite de repetibilidade (r) como sendo o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95 %), a diferença absoluta entre duas determinações (x_i, x_{i-1}) obtidas sob as condições acima referidas, ou seja, este é determinado a partir do desvio-padrão, associado aos resultados obtidos sob condições de repetibilidade, de modo a ser possível averiguar pelo analista se existem diferenças significativas entre as análises realizadas. Na prática aceitam-se os resultados obtidos se a amplitude entre os dois ensaios sucessivos for inferior ao limite de repetibilidade, caso contrário dever ser feito uma análise crítica e, se necessário, recorrer à repetição dos ensaios (INMETRO, 2010; RELACRE, 2000). O limite de repetibilidade é dado pela equação:

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_i^2} \quad (6.10)$$

6.4.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, como o analista, os equipamentos e/ou os dias das análises. Isto para verificar que mesmo variando as condições da análise o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, a mais aconselhável de usar (RELACRE, 2000; Ribani *et al.*, 2004).

6.5 Exatidão

O Guia RELACRE define a exatidão como sendo a aproximação entre o resultado de uma medição ou a média dos resultados obtidos e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (Ribani *et al.*, 2004). A exatidão é expressa como um erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático pode ocorrer devido a perdas do analito devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (Brito *et al.*, 2005).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são geralmente o uso de materiais de referência, a participação em ensaios interlaboratoriais, a comparação com métodos de referência e a realização de ensaios de recuperação, sendo este último o mais aplicado (INMETRO, 2007). O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa (Ribani *et al.*, 2004). Segundo Almeida (2012) a Conferência Internacional de Harmonização recomenda pelo menos a realização de nove determinações juntamente com as percentagens de recuperação.

A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de

uma quantidade conhecida do analito de interesse, seguida da sua extração e quantificação de maneira a verificar a percentagem de recuperação (Brito *et al.*, 2005; Ribani *et al.*, 2004). Podem ser adicionadas às amostras uma quantidade de padrão em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de deteção, próximo à concentração máxima admissível e numa concentração próxima à média da gama de trabalho (INMETRO, 2007).

A percentagem de recuperação é calculada pela equação (6.11) (INMETRO, 2010),

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_R - C_A}{C_P} \right) \times 100 \quad (6.11)$$

Em que C_R representa a concentração do analito na amostra fortificada, C_A a concentração do analito na amostra não fortificada e C_P a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

7. Metodologia Experimental

A realização da validação do método de quantificação da ocratoxina A (OTA) por HPLC (*High-performance liquid chromatography*) em cereais e café decorreu no Laboratório de Química da SGS Portugal, em Lisboa. Para tal foram utilizados equipamentos, materiais e reagentes cedidos pela empresa.

O procedimento efetuado para cada amostra foi uma adaptação da Norma EN 14132:2009 – “*Foodstuffs: Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee. HPLC method with immunoaffinity column clean-up*” e da bula “OCHRAPREP®- *Quantitative detection of ochratoxin A*”, de modo a serem obtidas as condições mais adequadas para a validação do método.

Neste capítulo são descritos os reagentes, materiais e equipamentos necessários para a metodologia experimental e a descrição do processo.

7.1 Amostras

Visto os alimentos mais suscetíveis à contaminação de ocratoxina A serem os cereais e o café, para a determinação e quantificação desta micotoxina foram escolhidos um produto de cereais, bolachas crackers constituídas essencialmente por farinha de trigo, e café torrado moído, ambos obtidos num estabelecimento comercial em Lisboa – Portugal.

7.2 Reagentes e preparação de soluções

Para a amostra de cereais, foi preparado o solvente de extração, para extrair a possível presença de ocratoxina A das amostras em estudo, usando uma mistura de acetonitrilo (ACN) para HPLC da Sigma - Aldrich e água ultrapura ou Mili-Q da Milipore, na proporção 60:40 respetivamente. O solvente de extração para o café foi 50:50 de metanol (MeOH) para HPLC adquirido na Carlo Erba e a solução de hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,36 M. Sendo esta última preparada com 30 g de NaHCO_3 , (Panreac), pesados numa balança analítica Mettler Toledo ($d=0,0001\text{g}$) para um balão volumétrico de 1 L e dissolvidos em água ultrapura.

A solução tampão fosfato (*phosphate buffered saline* – PBS), com um pH de 7,4 ajustado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,20 M, foi usada para diluir as amostras e ativar as colunas de imunoafinidade (OCHRAPREP®). Esta solução é constituída por 0,2 g de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), 1,2 g de hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), obtidos na Panreac, e 0,2 g de cloreto de potássio (KCl) da Scharlau. Estes são dissolvidos em água ultrapura num balão volumétrico de 1 L, sendo aferido o volume final com a mesma.

Para recuperar a ocratoxina A retida na coluna de imunoafinidade (R-Biopharm), foi necessário preparar o solvente de desorção com 98,0 mL de metanol para HPLC e 2,0 mL de ácido acético glacial adquirido na Analar Normapur.

Como solvente a injetar no HPLC foi utilizado uma mistura de metanol para HPLC, água ultrapura e ácido acético glacial na proporção de 49:50:1, respetivamente.

A fase móvel utilizada é constituída por acetonitrilo para HPLC, água ultrapura e ácido acético glacial (CH_3COOH) na respetiva proporção 51:47:2, que serve como eluente pois separa os componentes da amostra ao longo da fase estacionária, dependendo da afinidade destes para com a coluna.

A curva de calibração é um passo importante para o processo de quantificação por HPLC, uma vez que a reta obtida, a partir da concentração dos padrões e das áreas dos picos respetivos, irá originar uma equação que será usada para calcular o teor da micotoxina na amostra (ng/mL). Assim, para a sua elaboração foi necessário preparar uma solução de padrão intermédio de ocratoxina A de 500 ng/mL a partir do padrão comercial 1 $\mu\text{g/mL}$ (Trilogy Analytical Laboratory) reconstituído com 5,0 mL de metanol para HPLC, medidos por micropipeta. Este padrão intermédio é feito de modo a economizar ao máximo o padrão comercial. Para a solução intermédia foi utilizado um balão volumétrico de 5,0 mL, onde foi pipetado 2,5 mL do padrão comercial sendo aferido o restante volume com metanol para HPLC. Seguidamente foram preparadas cinco soluções-padrão de ocratoxina A com as concentrações 0,500; 1,00; 2,00; 5,00 e 10,0 ng/mL em balões de 25,0 mL a partir da solução intermédia preparada anteriormente.

Na Tabela 6.1 estão representados os volumes utilizados para as respetivas concentrações da curva de calibração.

Tabela 7.1 –Curva de Calibração

Padrão (ng/mL)		Volume do padrão intermédio (μL)
STD1	0,500	25
STD2	1,00	50
STD3	2,00	100
STD4	5,00	250
STD5	10,0	500

Também foi utilizado corrente de azoto comprimido da Praxair, para evaporar o eluato obtido da coluna de imunoafinidade.

7.3 Métodos a validar

7.3.1 Cereais

Primeiramente, as bolachas crackers foram moídas, num moinho Retch, de modo a tornar mais fácil o processo de extração da micotoxina da amostra. De seguida, pesou-se 25 g de amostra moída, numa balança analítica Mettler Toledo ($d = 0,0001$ g), para um copo de 1 L,

onde lhe foi adicionado 100 mL do solvente de extração, que se tapou com folha de alumínio. Para que o processo de extração ocorresse mais rapidamente, levou-se o copo a agitar numa placa de agitação (Heidolph unimax 210) durante 3 minutos a alta velocidade. Após agitação a amostra foi filtrada para um erlenmeyer de 250 mL com papel de filtro Aroi 185 mm.

Foram retirados 4,0 mL do filtrado, para um gobelé de vidro, a fim de serem diluídos com 44 mL de PBS. A amostra diluída passou pela coluna de imunoafinidade (OCHRAPREP®, R. Biopharm) a um fluxo de 2 - 3 mL por minuto com a ajuda de uma seringa de 20 mL. Após a passagem da amostra, sem deixar secar, lavou-se a coluna com 10 mL de água ultrapura, a um fluxo de 5 mL por minuto. Posteriormente secou-se a coluna ao passar ar pela mesma pressionando o êmbolo da seringa, o que permitiu remover o máximo de vestígios de líquido. De seguida foram adicionados 1,5 mL de solvente de desorção, a fim de eluir a micotoxina da coluna, que foi recolhido num vial, realizando três vezes *backflushing*. Este sistema consiste em levantar e baixar suavemente o êmbolo da seringa durante a passagem do eluente pela coluna de imunoafinidade, de modo a aumentar o tempo de contacto do solvente com o anticorpo no interior da suspensão de gel e assegurar que toda a micotoxina foi eluída, como exemplificado na Figura 7.1.

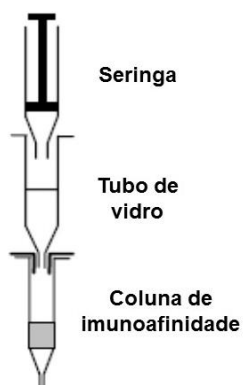


Figura 7.1 – Exemplo da montagem para realização da passagem de ar pela coluna e do *backflushing*.

Visto o solvente de desorção não ser o mais adequado para injeção no HPLC este foi evaporado com corrente de azoto, e após secar o resíduo foi redissolvido com 1,0 mL de solvente de injeção e homogeneizado no vortex VWR. Depois foram injetados 100 µL da alíquota final no HPLC (Agilent Technologies 1260 infinity).

7.3.2 Café

Pesou-se 15 g de café numa balança analítica Mettler Toledo ($d = 0,0001$ g), para um erlenmeyer de 500 mL, sendo de seguida adicionado 150 mL de solvente de extração e o frasco tapado com papel de alumínio. Agitou-se a amostra numa placa de agitação durante 30 minutos a alta velocidade.

Posteriormente, filtrou-se a amostra com papel de filtro (Aroi 185 mm) e retiraram-se 10 mL de filtrado para um copo de vidro para que fossem diluídos com 10 mL de PBS. Passou-se a amostra diluída por uma coluna de imunoafinidade a um fluxo de 2 - 3 mL por minuto, com a ajuda de uma seringa. Após a passagem de toda a amostra pela coluna, esta foi lavada com 10 mL de água ultrapura a um fluxo de 5 mL por minuto até secar.

A micotoxina fixa na suspensão de gel foi eluída com 4 porções de 1 mL de desorção para um vial, executando *backflushing* três vezes para cada porção. De seguida o eluato foi evaporado com corrente de azoto até secar, sendo depois redissolvido com 1 mL de solvente de injeção e uniformizado no vortex, a fim de serem injetados 100 µL no HPLC (Agilent Technologies 1260 infinity).

7.3.3 Condições da cromatografia líquida de alta eficiência

Para a quantificação de ocratoxina A nas amostras de café e cereais em estudo, o HPLC foi configurado com os parâmetros apresentados na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 – Condições cromatográficas

Pré-coluna	Fase reversa: 4,6 mm x 12,5 mm Tamanho partículas: 5 µm Marca: Teknokroma BRISA LC2 C18
Coluna	Fase reversa: 4,6 mm x 250 mm; Tamanho de partículas: 5 µm Marca: Teknokroma BRISA LC2 C18
Volume injeção	100 µL
Bomba/Fluxo	Isocrática: 1,0 mL/min
Temperatura do forno	40 °C
Detetor	Fluorescência (FLD) Emissão: 443 nm Excitação: 333 nm
Tempo de corrida	20 minutos
Fase móvel	ACN: H ₂ O: CH ₃ COOH (51:47:2)

7.3.4 Quantificação de ocratoxina A por HPLC

De modo a quantificar a amostra quanto ao seu teor de ocratoxina A em ng/mL, foram injetados os padrões preparados para a curva de calibração no HPLC a fim de se obter uma equação da reta (7.2).

$$y = ax + b \quad (7.2)$$

Sendo que **y** representa a área do pico, **a** o declive da reta, **x** a concentração da ocratoxina A na amostra e **b** a ordenada na origem. A equação da reta mostra a relação matemática entre o valor de **x** (concentração de ocratoxina A) e a medida de **y** (área do pico).

Para se considerar os dados obtidos válidos deve verificar-se o valor de R^2 (coeficiente de correlação), que deverá estar o mais próximo de 1, pois quanto mais próximo de 1 menor será o valor do desvio padrão residual e, conseqüentemente, menor será a incerteza associada ao resultado final do ensaio. O valor mínimo aceite é 0,995, abaixo disso é recomendável que a análise seja realizada novamente (Marques, 2007; RELACRE, 2000).

Um vez que a equação da reta indica o teor de micotoxina em nanogramas por mililitro de amostra e o resultado final pretendido consiste em saber a quantidade de ocratoxina A em microgramas (μg) por kilograma (Kg) de amostra, foi necessário recorrer à expressão matemática (7.3).

$$\text{OTA } (\mu\text{g/kg}) = \frac{m_{\text{OTA}}}{10} \times \left(\frac{V_3}{V_4}\right) \times \left(\frac{V_1}{V_2}\right) \times \left(\frac{1000}{m}\right) \times \left(\frac{1}{1000}\right) \quad (7.3)$$

Onde, m_{OTA} representa a concentração de OTA correspondente à área do pico, obtida da reta de calibração presente no volume de injeção; **m** a massa da toma analítica em gramas; **V₁** o volume do solvente de extração em mililitro; **V₂** a fração do volume do filtrado de amostra que entra na coluna de imunoafinidade em mililitro; **V₃** o volume final obtido após eluição em mililitro e **V₄** a fração de volume da solução de amostra injetada na coluna HPLC em mililitro.

Para cada análise realizada foi necessário fortificar uma amostra de modo a garantir que possíveis interferências de matriz não influenciavam a deteção do analito, neste caso a ocratoxina A. Segundo o Regulamento (UE) Nº 519/2014 de 16 de maio de 2014 um ensaio para a determinação de ocratoxina A apenas é considerado válido se a amostra fortificada apresentar uma percentagem de recuperação entre os 50 e 120 %.

O procedimento para a amostra fortificada foi realizado do mesmo modo das restantes amostras, sendo esta sujeita à adição de uma quantidade de padrão de concentração conhecida. A porção de padrão a ser adicionada é determinada de forma a garantir que a amostra fortificada se encontre sempre dentro da curva de calibração. Posto isto, foram adicionados 0,200 mL da solução intermédia (500 ng/mL) à amostra de cereais e 0,120 mL à de café, no início do procedimento, de modo a que a alíquota final a ser injetada no HPLC apresentasse uma fortificação de 4 ng/mL de ocratoxina A. Se a massa de ocratoxina A na amostra cair fora da gama da reta de calibração ajusta-se a quantidade injetada, diluindo essa fração de amostra.

8. Resultados e Discussão da validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC

Visto o método a validar se tratar de uma análise quantitativa e uma determinação de concentrações residuais de ocratoxina A, foram considerados todos os requisitos analíticos para o processo de validação, mencionados no Guia RELACRE nº13. Uma vez que o método de quantificação foi efetuado em amostras distintas, cereais e café torrado, e as condições cromatográficas serem idênticas, foi necessário realizar uma curva de calibração que abrangesse ambos os produtos alimentares, permitindo analisar ambas as amostras simultaneamente.

8.1 Curva de Calibração

8.1.1 Gama de trabalho

Depois de várias tentativas para encontrar a gama de trabalho mais adequada para o método de quantificação de ocratoxina A em alimentos, chegou-se às seguintes concentrações de padrão: 0,500 ng/mL, 1,00 ng/mL, 2,00 ng/mL, 5,00 ng/mL e 10,0 ng/mL. Na tabela 8.1 estão apresentados os valores das concentrações e os respetivos sinais cromatográficos, referentes à área do pico, que deram origem à reta de calibração ilustrada na Figura 8.1.

Tabela 8.1 – Padrões da curva de calibração e o respetivo sinal cromatográfico

Concentração (ng/mL)	Área do pico cromatográfico
0,500	0,12
1,00	0,21
2,00	0,44
5,00	1,2
10,0	2,4

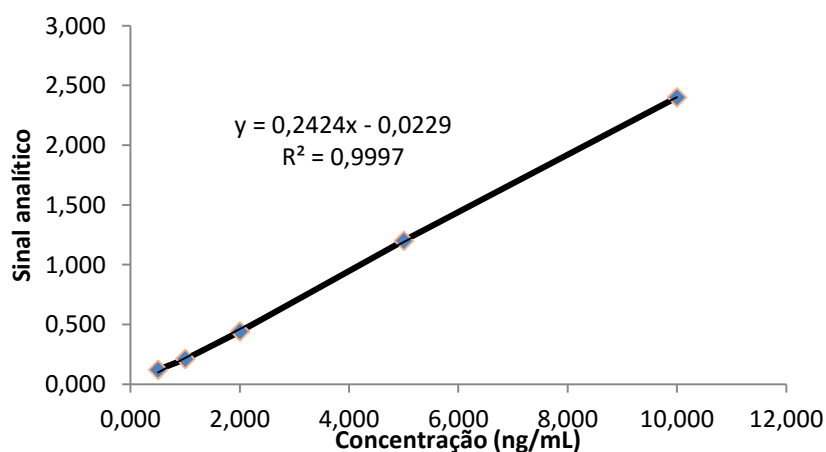


Figura 8.1 – Curva de Calibração da ocratoxina A na gama de concentrações de 0,500 a 10,0 ng/mL

Para a avaliar a gama de trabalho foi efetuado o teste de homogeneidade das variâncias, analisando 10 vezes o primeiro (0,500 ng/mL) e o último padrão (10,0 ng/mL). Nas Figuras 8.2 e 8.3 estão expostos um dos cromatogramas obtidos para os padrões 0,500 e 10,0 ng/mL, respetivamente.

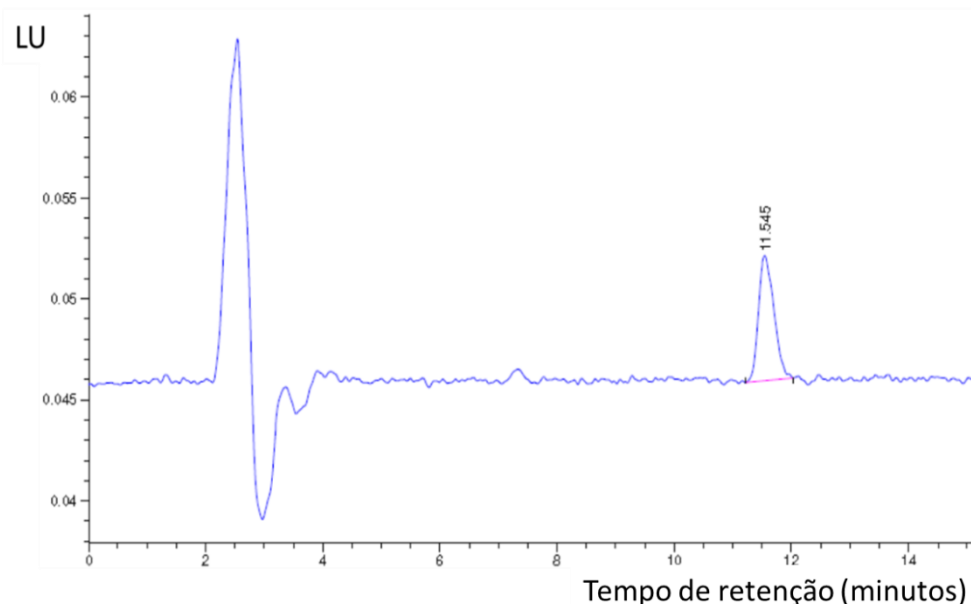


Figura 8.2 – Cromatograma correspondente ao padrão 0,500 ng/mL

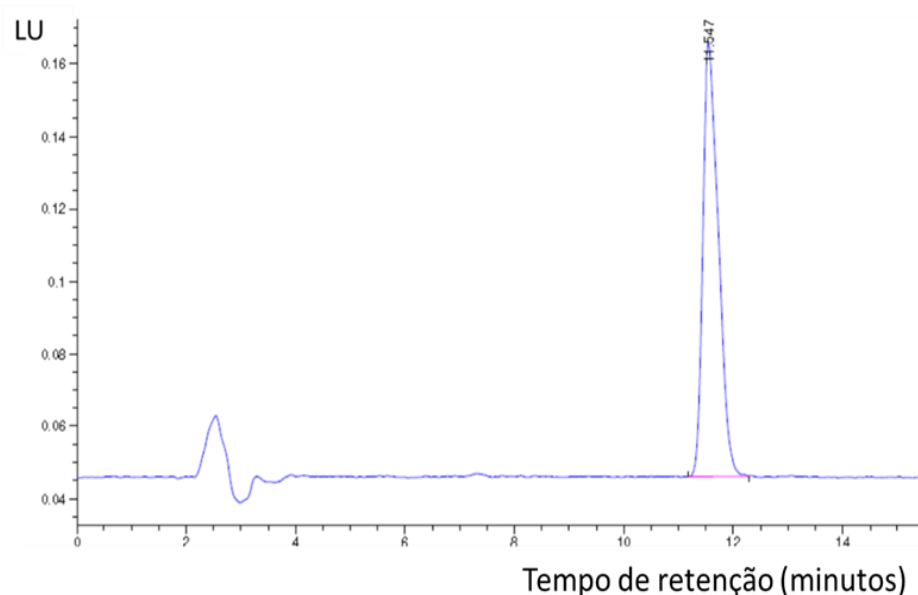


Figura 8.3 – Cromatograma correspondente ao padrão 10,0 ng/mL

Os cromatogramas alcançados facultam os valores da área do pico e do tempo de retenção relativo à micotoxina em estudo, sendo de 0,12 e 11,6 minutos, respetivamente, para o padrão mais baixo. Para o padrão mais alto obtêm-se uma área mais elevada, de 2,4, e um tempo de retenção semelhante ao padrão mais baixo, visto se tratar do mesmo analito.

Os resultados observados na Tabela 8.2 foram utilizados para calcular as variâncias associadas ao primeiro e último padrão utilizando as equações (6.1) e (6.2),

Tabela 8.2 – Áreas dos picos, valor médio, desvio padrão e variância dos padrões 0,500 ng/mL e 10,0 ng/mL

	Área dos picos cromatográficos	
	Padrão 0,500 ng/mL	Padrão 10,0 ng/mL
	0,09	2,40
	0,10	2,40
	0,10	2,40
	0,10	2,40
	0,10	2,40
	0,11	2,40
	0,12	2,40
	0,12	2,40
	0,13	2,40
	0,13	2,30
Valor médio	0,11	2,39
Desvio padrão	0,01	0,03
Variância	0,0002	0,001

Para avaliar o valor das variâncias foi calculado o PG pela equação (6.3). Sendo neste caso, S_i^2 o valor da variância do padrão 10,0 ng/mL e S_j^2 do padrão 0,500 ng/mL, obtendo-se um PG igual a 5,00. Para averiguar a existência de diferenças significativas entre as variâncias comparou-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher, para um intervalo de confiança de 99 % e para $(n - 1)$ graus de liberdade, que para este caso era igual a 9. Sendo o valor tabelado de 5,35. Assim apurou-se que o resultado de PG foi inferior ao valor crítico (F), ou seja, não existem diferenças significativas entre as variâncias, sendo a gama de trabalho utilizada adequada.

Outro ponto examinado foi o sistema cromatográfico de modo a investigar se este era adequado para a determinação de ocratoxina A. Para isso foram usados os dados fornecidos pela homogeneidade de variâncias, a fim de se determinar o coeficiente de variação (CV %), utilizando as equações (6.4) e (6.5). Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 8.3.

Tabela 8.3 – Análise ao sistema cromatográfico para a o padrão 0,500 ng/mL

	Área do pico	Tempo de retenção
	0,100	11,64
	0,100	11,62
	0,100	11,62
	0,100	11,63
	0,110	11,62
Valor médio (\bar{x})	0,100	11,62
Desvio padrão (s)	0,004	0,01
Coefficiente de variação (CV %)	4,4	0,08

Uma vez que o CV (%) em área foi inferior a 5 % e em tempo de retenção foi inferior a 2%, critérios internos da empresa, considerou-se o sistema cromatográfico adequado para a análise de ocratoxina A.

8.1.2 Linearidade

Foi avaliada a linearidade da curva de calibração apresentada na Figura 8.1. Através da inspeção gráfica constatou-se que a curva de calibração é linear, uma vez que o coeficiente de correlação é próximo da unidade. Para comprovar estatisticamente esta constatação foi realizado o teste de RIKILT. Para isso foram utilizadas as equações apresentadas na secção 6.1.2, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 8.4

Tabela 8.4 – Concentração do padrão e respetivo sinal instrumental, razão entre o sinal analítico e a concentração do padrão e a percentagem de linearidade para cada ponto da reta e a média das razões

n	X _i	Y _i	y _i /x _i	y _i /x _i (%)
1	0,500	0,12	0,24	104
2	1,00	0,21	0,21	91
3	2,00	0,44	0,22	96
4	5,00	1,20	0,24	104
5	10,0	2,40	0,24	104
Média (y_i/x_i)_m			0,23	

Com os valores da Tabela 8.4 foi criado um gráfico, mostrado na Figura 8.4, onde o eixo das abcissas representa as concentrações do analito e o eixo das ordenadas os valores das percentagens calculadas.

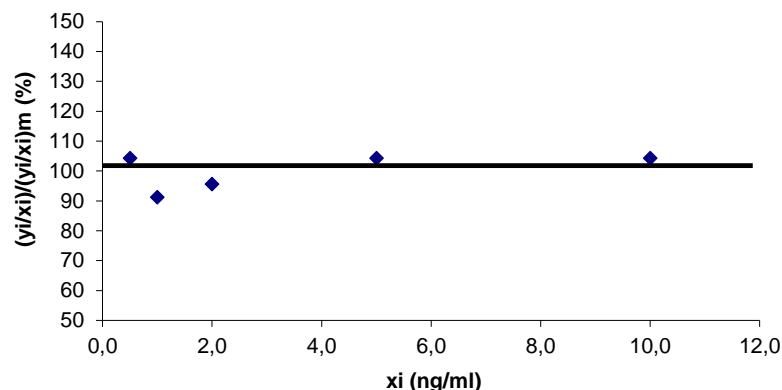


Figura 8.4 – Teste de RIKILT para avaliar linearidade

Analisando a Tabela 8.4 e a Figura 8.4 averiguou-se que cada ponto da reta de calibração está situado entre os 90% e os 110%, respeitando as condições do teste RIKILT e comprovando que a função de calibração é linear.

8.2 Limiares analíticos

8.2.1 Limite de deteção

Para ter uma ideia do limite de deteção (LD) do método em estudo, calculou-se o mesmo para a primeira curva de calibração, apresentada na Figura 8.1. Para isso foram usadas as equações (6.7) e (6.8) assim como os valores expostos na Tabela 8.1. Resultando num LD de 0,266 ng/mL.

8.2.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação deste método corresponde ao primeiro ponto da curva de calibração, sendo confirmado no início de cada análise através da expressão matemática (6.9). Para as várias curvas de calibração efetuadas ao longo do processo de validação, o limite de quantificação obtido variou entre 0,500 e 0,800 ng/mL.

Os valores dos limiares analíticos podem variar ligeiramente, uma vez que são preparadas diariamente novas curvas de calibração para a mesma gama de trabalho, havendo possivelmente oscilações na estabilidade dos padrões até o momento da sua injeção no HPLC, assim como nos volumes pipetados na preparação dos padrões devido à incerteza associada ao material.

8.3 Precisão

Para a validação da metodologia em questão foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermédia. Segundo o Guia RELACRE, para estudar a repetibilidade são necessários pelo menos 10 medições, sobre a mesma amostra, e no mínimo 15 para a precisão intermédia.

8.3.1 Repetibilidade

De modo a estudar a repetibilidade do método, para as amostras de café e de cereais em estudo, foram realizadas 10 determinações de cada matriz e calculada a concentração de analito presente, assim como o respetivo valor médio, desvio padrão, limite de repetibilidade, repetibilidade (%) e coeficiente de variação. Visto a repetibilidade ter sido analisada num dia posterior aos outros parâmetros, sendo que também as duas matrizes foram analisadas em dias diferentes, foram preparadas novas curvas de calibração, resultando em $y = 0,2381x + 0,0251$ para as bolachas crackers e $y = 0,2291x + 0,0262$ para o café. De sobressair que a determinação da concentração de analito ($\mu\text{g/Kg}$) nas amostras foi realizada segundo a equação (7.3). Pelo facto de na amostra de cereais não ter sido detetada a presença de ocratoxina A foi necessário fortificar as 10 alíquotas analisadas com 4 ng/mL de analito, de modo a ser possível avaliar a repetibilidade. Posto isto, os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 8.5.

Tabela 8.5 – Resultado da avaliação da repetibilidade para uma amostra de cereais e café torrado

Tipo de amostra	Concentração ($\mu\text{g/Kg}$)	Tipo de amostra	Concentração ($\mu\text{g/Kg}$)
Bolachas crackers	2,70	Café	7,30
	2,50		7,20
	2,70		7,23
	2,50		7,29
	2,62		7,31
	2,79		7,26
	2,59		7,07
	2,49		7,08
	2,78		7,31
	2,79		7,04
Média	2,65	Média	7,21
Desvio padrão	0,12	Desvio padrão	0,11
Nº de medições	10		
Limite de Repetibilidade	0,34	Limite de Repetibilidade	0,30
CV (%)	4,5	CV (%)	1,5

Analisando a Tabela 8.5 pode-se constatar que se obteve um limite de repetibilidade de 0,34 e 0,30 para os cereais e o café respetivamente, com um nível de confiança de 95 %. Ou seja, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de repetibilidade, não deverá exceder os valores de 0,34 para cereais e 0,30 para cafés.

Na amostra de cereais apurou-se uma diferença máxima, entre duas concentrações, de 0,30 µg/Kg e, de 0,27 µg/Kg para a amostra de café. Uma vez que os ensaios respeitam o limite de repetibilidade, os resultados foram aceites por não haver diferenças significativas. Para validar o método em termos de repetibilidade o CV (%) deve ser inferior a 5,0 %. Visualizando os dados da Tabela 8.5, verifica-se que para ambas as amostras este requisito também foi atingido, sendo de 4,5 % para a amostra de cereais e 1,5 % para o café.

8.3.2 Precisão intermédia

Para determinar a precisão intermédia de um método foram aproveitadas as 10 medições da repetibilidade, de cada matriz, realizadas no mesmo dia e, num dia posterior repetiu-se o ensaio, com o mesmo analista, realizando mais 5 determinações. Portanto a condição que variou neste parâmetro foi o dia da análise. As cinco novas medições, de cada amostra, como foram realizadas num dia diferente das restantes, foram preparadas novas curvas de calibração, resultando em $y = 0,2352x + 0,0498$ para a amostra de cereais e em $y = 0,2294x + 0,0232$ para o café. Os resultados da avaliação da precisão intermédia, para as amostras de café e de cereais, pode ser observada na Tabela 8.6.

Tabela 8.6 – Resultado da avaliação da precisão intermédia para uma amostra de cereais e café, realizadas em datas diferentes pelo mesmo analista

Tipo de amostra	Concentração µg/Kg	Tipo de amostra	Concentração µg/Kg
Bolachas Crackers 1º dia (28/09/2015)	2,70	Café 1º dia (3/11/2015)	7,30
	2,50		7,20
	2,70		7,23
	2,50		7,29
	2,62		7,31
	2,79		7,26
	2,59		7,07
	2,49		7,08
	2,78		7,31
	2,79		7,04
Bolachas Crackers 2º dia (29/09/2015)	2,43	Café 2º dia (4/11/2015)	6,87
	2,47		7,21
	2,74		7,02
	2,72		7,22
	2,74		7,52
Média	2,64	Média	7,20
Desvio padrão	0,13	Desvio padrão	0,16
N	15		
Precisão Intermédia	0,36	Precisão intermédia	0,44
CV (%)	4,9	CV (%)	2,2

A precisão intermédia é considerada validada se o coeficiente de variação for inferior a 5,0 %. Observando os resultados obtidos na Tabela 8.6 verificou-se que tanto o CV (%) para os cereais como para o café foram inferiores ao critério exigido, sendo de 4,9 % e 2,2 %, respetivamente. Assim, pode-se concluir que o requisito exigido para considerar o parâmetro aprovado foi cumprido.

Tanto na repetibilidade como na precisão intermédia, o CV (%) obtido para os cereais foi superior ao do café, isto pode dever-se ao facto da amostra de cereais não apresentar ocratoxina A, sendo necessário a adição de uma quantidade do analito em estudo para validar estes dois parâmetros, resultando deste modo em concentrações mais instáveis e consequentemente num coeficiente de variação superior.

8.4 Exatidão

Neste trabalho, foram realizados doze ensaios de recuperação para cada amostra, de modo a avaliar a exatidão do método.

Visto este parâmetro ter sido avaliado numa altura posterior dos anteriores, sendo que também as duas matrizes foram analisadas em dias diferentes, foi necessário preparar uma nova curva de calibração, advindo a equação $y = 0,2496x - 0,040$ para as bolchas *crackers* e $y = 0,2294x + 0,0232$ para o café.

Na Figura 8.5 e 8.6 estão representados um dos cromatogramas obtidos para a amostra de cereais não fortificada e fortificada, respetivamente.

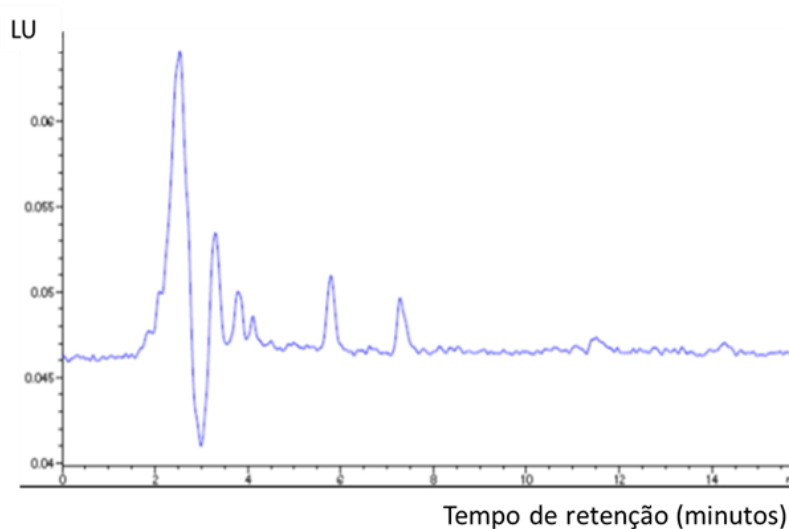


Figura 8.5 – Cromatograma da amostra de cereais não fortificada

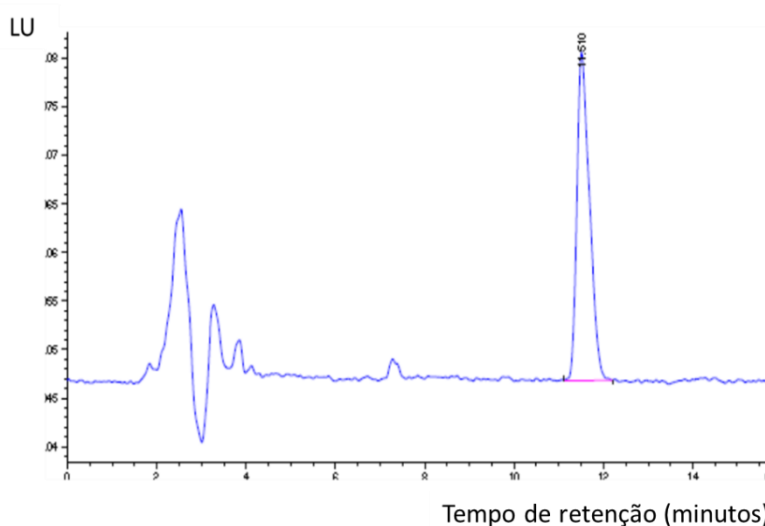


Figura 8.6 – Cromatograma da amostra de cereais fortificada com 4 ng/mL de ocratoxina A

Observando as figuras acima, apurou-se que na amostra não fortificada não foi detetada a presença de analito, devido à ausência do pico. Já na amostra fortificada, após

adição de 4 ng/mL de analito, ao minuto 11,5 apareceu o pico da ocratoxina A com uma área de 0,67, que corresponde a uma concentração de 2,47 µg/Kg.

Para a amostra de café foi realizado o mesmo procedimento, resultando nos cromatogramas apresentados nas Figuras 8.7 e 8.8 para os ensaios não fortificado e fortificado, respetivamente.

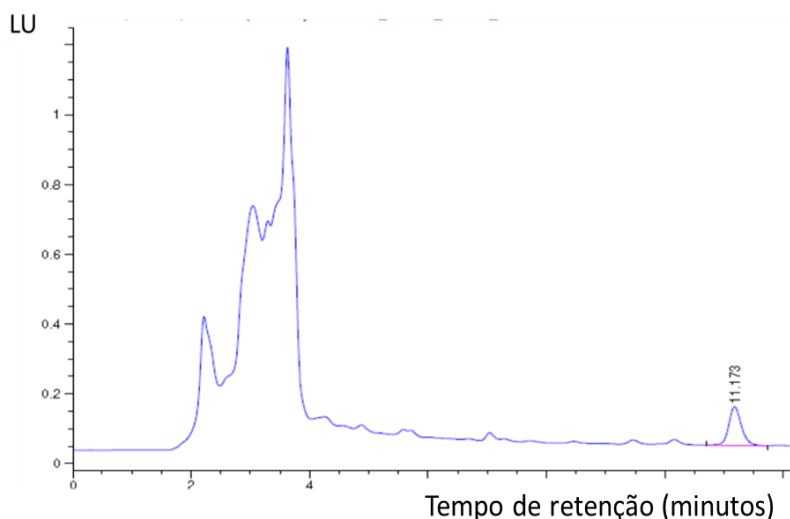


Figura 8.7 – Cromatograma da amostra de café não fortificada

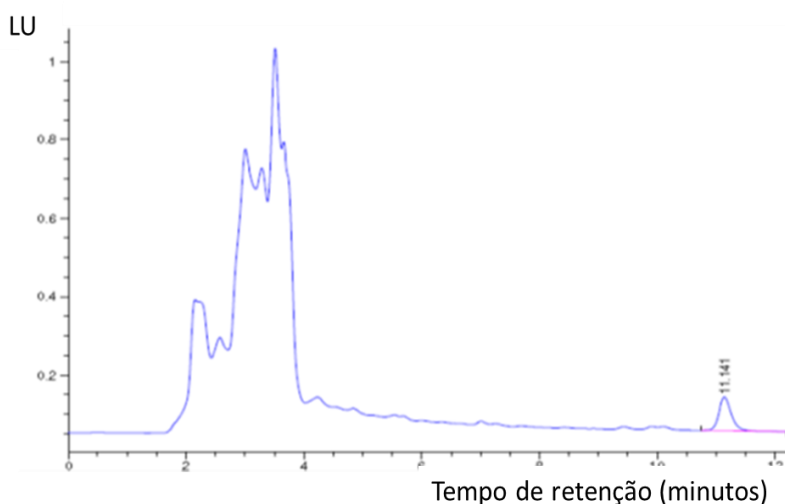


Figura 8.8 – Cromatograma da amostra de café fortificada com 4 ng/mL com uma diluição (1:2)

De acordo com a Figura 8.7 constatou-se a presença de ocratoxina A na amostra não fortificada por exibir um pico ao minuto 11,2 com uma área de 2,0. Após fortificação da amostra verificou-se que o pico obtido apresentava uma área de 3,7, ou seja superior à gama de trabalho, assim de forma a manter o resultado dentro da faixa de concentrações, utilizadas para a curva de calibração foi feita uma diluição de 1:2, resultando no cromatograma observado na Figura 8.8, com um pico que surge aos 11,1 minutos e com uma área de 1,9.

Tendo em consideração o mencionado acima são apresentados os resultados da avaliação da exatidão na Tabela 8.7, segundo ensaios de recuperação para as amostras de cereais e café.

Tabela 8.7 – Resultado da análise à exatidão do método para a amostra de cereais e café

Amostras	Concentração amostra não fortificada (ng/mL)	Concentração amostra fortificada (ng/mL)	Concentração adicionada (ng/mL)	Recuperação (%)
Cereais	0	2,46	4	61,5
	0	3,38		84,5
	0	3,30		82,5
	0	2,71		67,8
	0	2,46		61,5
	0	2,62		65,5
	0	3,13		78,2
	0	2,88		72,0
	0	2,62		65,5
	0	2,37		59,2
	0	2,83		70,8
	0	2,38		59,5
	Média			
Desvio padrão				8,8
CV (%)				12,7
Café (Diluição 1:2)	4,36	8,18	4	95,5
	4,36	8,31		98,8
	4,36	8,75		109,8
	4,36	8,75		109,8
	4,36	8,31		98,8
	4,36	8,75		109,8
	4,36	8,75		109,8
	4,36	8,75		109,8
	4,36	8,75		109,8
	4,36	8,75		109,8
	4,36	7,87		87,8
	4,36	8,31		98,7
Média				104,0
Desvio padrão				7,7
CV (%)				7,4

Ao analisar os resultados indicados na Tabela 8.6 verifica-se uma média de recuperação de 69,0 % para a amostra de cereais e de 104,0 % para amostra de café, estando estes valores dentro do intervalo de aceitação (50-120%) dado pelo Regulamento (UE) Nº 519/2014 de 16 de maio de 2014, para a ocratoxina A. Assim pode afirmar-se que a exatidão deste método foi validada.

9. Conclusão

Este trabalho surgiu com o objetivo de realizar e validar o método de quantificação de ocratoxina A em cereais e café por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma vez que a SGS tinha apenas como alternativa para esta análise o método imunológico *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). A monitorização de micotoxinas, nomeadamente ocratoxina A, nos alimentos como nos cereais e café, é um procedimento que tem de constituir uma rotina sistematizada. O presente trabalho contribui, assim, para este objetivo.

A validação é um processo dinâmico constante, que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos equipamentos, materiais e da mão-de-obra, continuando no decorrer da fase experimental.

Para validar a metodologia foram realizados estudos de linearidade, limites de deteção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão.

Foi escolhida uma gama de trabalho que pudesse ser utilizada para analisar diferentes matrizes alimentares simultaneamente, neste caso cereais e os seus derivados e café torrado. Relativamente à linearidade, esta foi verificada entre as concentrações 0,500 ng/mL e 10,0 ng/mL, uma vez que se conseguiu um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,995. De modo a evitar incertezas associadas a resultados que saiam fora da gama linear, deve-se nesses casos proceder à diluição da amostra para concentrações superiores ao padrão mais alto da curva de calibração, como sucedeu com a amostra de café analisada. No caso de serem concentrações inferiores a 0,500 ng/mL deve fortificar-se a amostra de modo à quantidade de analito se encontrar dentro do intervalo da gama de trabalho. Quanto ao limite de deteção foi de 0,266 ng/mL e o limite de quantificação (LQ) corresponde ao primeiro ponto da curva de calibração, sendo este confirmado diariamente. Como existem vários fatores que podem oscilar durante a preparação dos padrões da curva de calibração o LQ deste método encontra-se entre 0,500 e 0,800 ng/mL. Em termos de repetibilidade e precisão intermédia, para ambas as matrizes a metodologia também foi validada pois apresentaram um coeficiente de variação inferior a 5 %. Por último, foi avaliada a exatidão do método recorrendo à realização de ensaios de recuperação para ambas as amostras em estudo. Onde se obtiveram resultados positivos, ou seja estes apresentaram-se dentro do critério de aceitação (50-120 %) assinalado no Regulamento (UE) Nº 519/2014 de 16 de maio de 2014, para a ocratoxina A, confirmando-se assim a exatidão do método.

Outro ponto a ter em conta para a validação de um método, é este ser capaz de fornecer dados válidos tanto numa amostra com ou sem o analito em estudo. Durante o processo de validação foi possível verificar que o método validado teve capacidade de analisar os dois tipos de amostras, uma vez que a amostra de cereais não apresentou o pico correspondente à ocratoxina A, sendo necessário a adição de padrão para avaliar certos parâmetros, ao contrário da amostra de café.

Deste modo, pode-se concluir que o método proposto para a quantificação de ocratoxina A em cereais e café apresentou resultados confiáveis para poder ser utilizado regularmente para essa finalidade. Passando a fazer parte da ampla gama de análises a produtos que a SGS Portugal executa. Concluindo-se também que o processo de validação é uma etapa indispensável para garantir a qualidade e credibilidade dos resultados obtidos por um método validado.

Após a otimização e validação deste método, e sendo estes processos contínuos são sugeridas seguidamente algumas propostas que podem ser realizadas futuramente:

- ✓ Avaliar a estabilidade das soluções amostra e padrão, ao longo do tempo, enquanto se encontram na bancada de trabalho e também quando se encontram nos *vials* antes de serem injetados.
- ✓ De modo a garantir a viabilidade do método validado para alimentos à base de cereais, uma vez que só se utilizou um tipo de matriz (bolachas à base de trigo) poderá repetir-se esta etapa usando outro tipo de cereal.
- ✓ Participar em ensaios interlaboratoriais ou utilizar materiais de referência certificados como outra forma de avaliar a exatidão.

10. Referências Bibliográficas

- Alcaide, F. J. E.; Aguilar, S. A. (2013) Validation study of immunochemical ELISA assay for ochratoxin A quantification in dessert wines from sun-dried grapes. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, Vol. 23, Nº1, pp. 53-60.
- Almeida, M. R. S. (2012) Validação de um Método Analítico: Determinação de fósforo total. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra – Coimbra, 108 p.
- Amado, M. A. (2002) Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: Vantagens e inconvenientes. *Millenium*, Vol. 26, 14 p.
- ASAE (2015) Alimentação e Gravidez. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. *Riscos e Alimentos*, Nº10, 31 p.
- Azevedo, S. (2015) A Arte do Café: Do Expresso ao Cappuccino. Workshop. Academia do Café: Lisboa.
- Brito, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. (2005) Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Vol. 13, pp. 129-146.
- Cacique, A. P. (2012) Determinação de ocratoxina A em uva e produtos processados por cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais – Montes Claros, 57 p.
- CFS (2014) Ochratoxin A in coffee. Centre for food safety. Disponível em: http://www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_fst/whatsnew_fst_Ochratoxin_A_in_Coffee.html Acedido a 16 de Fevereiro de 2016
- Chust, R. B. (1990) Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC). *Boletim SPQ*, Vol. 39, pp. 43-53.
- COM (2010) Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho: sobre a eficácia e coerência dos controlos sanitários e fitossanitários às importações de géneros alimentícios, alimentos para animais, animais e plantas. Comissão Europeia: Bruxelas, Nº 785, 18p.

Coronel, M. B.; Marin S.; Cano, G.; Ramos, A. J.; Sanchis, V. (2011) Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: Occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. *Food Control*, Vol. 22, pp. 414-419.

Costa, H. D. G. (2014) Análise instrumental de produtos agroalimentares. Técnicas cromatográficas. Dissertação de Mestrado. Escola de Ciências da Universidade do Minho – Braga, 86 p.

Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C. (1998) Cromatografia um breve ensaio. *Química nova na escola*, Nº 7, pp. 21-25.

Duarte, S. C.; Pena, A.; Lino, C. M. (2010) A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, Vol. 27, pp. 187-198.

Duris, D.; Guyot B. (2002) Café et contamination par l'ochratoxine A. *Plantations, Recherche et developpement*, 5 p.

EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, Vol. 101, 36 p.

EFSA (2006) Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal*, Vol. 365, 56 p.

Fani, M. (2012) As micotoxinas. *Aditivos & Ingredientes*, Nº89, pp. 42-54.

FAO (2006) Un café plus sûr. Disponível em : <http://www.fao.org/ag/fr/magazine/0607sp1.htm>
Acedido a 18 de Fevereiro de 2016.

FAO/WHO (2001) Report of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Agriculture and Consumer Protection, 33 p.

Faria, S. M. F. (2012) Implementação e validação de um método para determinação de contaminantes em vinho por microextração em fase sólida e GC-MS/MS e sua correlação com a análise sensorial. Tese de Doutoramento: Instituto Superior de Engenharia do Porto – Porto, 155 p.

Ferreira, A. S. (2013) Validação da Determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa – Lisboa, 94 p.

FIB (2009) As micotoxinas. *Food Ingredients Brasil*, Nº 7, pp. 32-40.

Figueiredo, T. M. P. (2012) Validação de métodos analíticos: Determinação do Teor de Açúcar numa amostra de produto alimentar. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra – Coimbra, 116 p.

Freire, F. C. O; Vieira, I. G. P.; Guedes, M. I. F; Mendes, F. N. P. (2007) Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. *Embrapa Agroindústria Tropical*, 1ª Ed. Fortaleza, 48 p. ISSN 1677-1915.

Fujii, S.; Garcia, L. B.; Hirooka, E. Y. (2004) Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. *Alimentos e Nutrição*, Vol. 15; Nº 3, pp. 273-284.

GACTA (2007) Contaminantes: Café mais seguro. Alimentos & alimentação. Gerência de Ações de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Brasília.

Hanai, T. (1999) HPLC: A Practical Guide. RSC Chromatography monographs: Cambridge, 144 p.

Harris, D. C. (2011) Explorando a Química Analítica. 4ª Ed., LTC: Rio de Janeiro, 572 p. ISBN: 978-85-216-1803-4

Henriques, M. L. G. S. (2008) Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa – Lisboa, 216 p.

Houbraken, J.; Samson, R. A. (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology*, Vol. 70. Nº 1, pp. 1-51.

IARC (1993) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56. *World Health Organization*: Lyon – France. 609 p. ISBN 92 832 1256-8.

IPAC (2010) Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025. Disponível em: <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC001.pdf> Acedido a 25 de Janeiro de 2016.

INMETRO (2007) Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008 Revisão 02, 25 p.

INMETRO (2010) Orientação sobre validação de métodos analíticos. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia DOQ-CGCRE-008, Revisão 03, 20 p.

Kabak, B. (2009) Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 47, pp. 348-352.

Kupiec, T. (2004) Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, Vol. 8, Nº 3, pp. 223-227.

Lanças, F. M. (2009) A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, Vol. 1, Nº 2, pp. 35-61.

Lattanzio, V.; M. T.; Ciasca, B.; Powers, S.; Visconti, A. (2014) Improved method for the simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in cereals and derived products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry after multi-toxin immunoaffinity clean up. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1354, pp. 139-143.

Lidon, F. C.; Almeida, A. S.; Leitão, A. L.; Silva, M. M.; Pinheiro, N.; Maças, B.; Costa R. (2014) A synoptic overview of durum wheat production in the Mediterranean region and processing following the European Union requirements. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, Vol. 26, Nº 8, pp. 693-705.

MAPA/ACS (2011) Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária 1ª Ed., MAPA/ACS, Brasília, 237 p. ISBN 978-85-7991-055-5.

Marques, M. F. C. (2007) Validação interna de determinação de deoxinivalenol e zearalenona por HPLC com purificação por colunas de imunoafinidade – Pesquisa de deoxivalenol e zearelenona em milho e alimentos compostos para animais. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa – Lisboa, 93 p.

Martins, H. M.; Magalhães, S. A.; Guerra, M. M. (2007) Determinação de ocratoxina A em alimentos compostos para animais (suínos e aves) por cromatografia líquida de alta resolução. Avaliação indireta do método. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Ano XIV, Nº1, 10 p.

Meyer, V. R. (2004) Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4ª Ed., John Wiley & Sons, Ltd, 369 p. ISBN: 0-470-09377-3.

Nogueira, S.; Oliveira, M. B. P. P. (2006) Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. *Alimentação Humana*, Vol.12, Nº2, pp. 39-45.

Nollet, L. M. L. (2000) Food analysis by HPLC. 7ªEd., Marcel Dekker: New York, 1170 p. ISBN: 0-8247-8460-X.

Norma EN 14132:2009 – “Foodstuffs: Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee. HPLC method with immunoaffinity column clean-up”. 18 p.

Onorio, O. C.; Rios, O. G.; Guyot, B.; Fontana, T. A.; Guiraud, J. P.; Gallindo, S. S.; Durand, N.; Quiroz, M. S. (2011) Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*, Vol. 22, pp. 1184-1188.

Pattono, D.; Gallo, P. F.; Civera, T. (2011) Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chemistry*, Vol. 127, pp. 374-377.

Pereira, L.J. A. (2008) Estratégias para o controlo de ocratoxina A em alimentos. Tese de Doutoramento. Escola de Engenharia da Universidade do Minho – Braga, 266 p.

Pereira, V. L.; Fernandes, J. O.; Cunha, S. C. (2012) Micotoxinas em Portugal: Ocorrência e Toxicidade. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, Vol. 2. Nº 1, pp. 61-73.

Pereira, V. L.; Fernandes, J. O.; Cunha, S. C. (2014) Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Food Science & Technology*, Vol. 36, pp. 96-136.

Peres, T. B. (2002) Palestra: Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, Vol.64, Nº 2, pp. 227-229.

Picó, Y. (2015) Análise Química dos Alimentos. 1ª Ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 368 p. ISBN: 978-85-352-7828-6

Prelle, A.; Spadaro, D.; Denca, A.; Garibaldi, A.; Gullino, M. L. (2013) Comparison of Clean-Up Methods for Ochratoxin A on Wine, Beer, Roasted Coffee and Chili Commercialized in Italy. *Toxins*, Vol. 5, pp. 1827-1844.

R-Biopharm Rhône LTD (2002) OCHRAPREP®- Quantitative detection of ochratoxin A. 5 p.

R-Biopharm Rhône Ltd (2004) Colunas de Imunoafinidade para a análise das micotoxinas. 2 p.

Regulamento (UE) Nº 519/2014 de 16 de Maio de 2014, Jornal Oficial da União Europeia L 147, 15 p.

Regulamento nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006, Jornal Oficial da União Europeia L 364, 20 p.

RELACRE (2000) Guia RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Relacre, Lisboa, 60 p. ISBN: 972-8574-02-9.

Ribani, M.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; Bottoli, C. B. G.; Melo, L. F. C. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*, Vol. 27, Nº5, pp. 771-780.

Ribeiro, E. A. R. (2007) Contaminação toxicológica de resíduos vitivinícolas- Ocratoxina A. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto – Porto, 125 p.

Ribeiro, I. (2008) Validação de métodos. Encontro de Técnicos de Laboratórios de Saúde Pública. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge – Lisboa.

Ribeiro, S. S. (2012) *Controlo da Qualidade em Vinhos: Ocratoxina A – OCHRACARD*. Disponível em:
http://www.ambifood.com/fotos/editor2/noticias/ocratoxina_a_workshop_porto.pdf

Romani, S.; Pinnavaia, G.G.; Rosa, M. D. (2003) Influence of Roasting Levels on Ochratoxin A Content in Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, pp. 5168-5171.

Rosseto, E. R.; Delai, R. M. (2013) Análise de contaminação por aflatoxina em farinhas de 6 variedades de trigo, pelo método de ELISA. *Cascavel*, Vol.6, Nº2, pp.142-149.

Schuster R.; Schulenberg-Schell H. (2000) A new approach to lower limits of detection and easy spectral analysis. *Agilent Technologies*, 54 p.

Serna, J. G.; Vázquez, C.; Sandino, F. G.; Valle, A. M.; González-Jaén, M. T.; Patiño, B. (2014) Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. *Food Research International*, Vol. 51, pp. 127-131.

Serra, R. (2005) Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. Tese de Doutoramento. Escola de Engenharia da Universidade do Minho – Braga, 399 p.

SGS (2012) SGS em Portugal - 90 anos. *Lusoimpress*, 39 p.

SGS (2014) Leadership and innovation since 1878. Disponível em:
<http://www.sgs.com/~media/Global/Documents/Brochures/sgs-group-history-en.ashx>

SGS (2016) Success Group profile 2016, 8p. Disponível em: <http://www.sgs.com/~media/global/documents/brochures/group-profiles/sgs-group-profile-en.pdf?la=en>

Silva, D. R. T. (2013) Avaliação da Qualidade de Presuntos de Suíno, Ovino e Caprino Relativamente à Contaminação por Micotoxinas. Dissertação de Mestrado. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança – Bragança, 75 p.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. (2001) Principios de Análisis Instrumental. 5ª Ed., McGraw-Hill : Madrid, 1024 p. ISBN : 0-03-002078-6.

Sociedade Geral de Superintendência (SGS). Disponível em: <http://www.sgs.pt/>. Acedido a 11 de Janeiro de 2016

Soleymani, E.; Jinap, S.; Abas, S. (2012) Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, Vol. 133, pp. 1055-1060.

Souza, M. L. M.; Gonçalves, E. B.; Silva, O. F.; Farias, A. X.; Cavalcanti, A. L. S. (2010) Verificação intralaboratorial da *performance* obtida em método de determinação de ocratoxina A por purificação em coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida de alta eficiência usando café. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol. 30, pp. 197-204. ISSN 0101-2061.

Taverniers, I.; Loose, M.; Bockstaele, E. V. (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Analytical Chemistry*, Vol. 23, Nº 8, pp. 535-552.

Uekane, T. M.; Bandeira, R. D. C. C.; Silva, M. C. (2010) Comparação de métodos de análise para ocratoxina A no café: uma revisão. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, Vol.2, Nº1, pp. 44-54.

Vidal, A.; Marín, S.; Morales, H.; Ramos, A. J.; Sanchis V. (2014) The fate of deoxynivalenol and ochratoxin A during the breadmaking process, effects of sourdough use and bran content. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 68, pp. 53-60.

Vieira, A. P.; Furlong, E. B.; Oliveira, M. L. M. (1999) Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol.19, Nº2, pp.221-225. ISSN 1678-457X.

Villa, P.; Markaki, P. (2009) Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: Occurrence and risk assessment. *Food Control*, Vol. 20, pp. 455-461.

Wakefield, D.R.; Company limited (2015) Ochratoxin in coffee: What you need to know. Disponível em: <http://news.drwakefield.com/Coffee-Trading/Ochratoxin-in-coffee-What-you-need-to-know/801772212> Acedido a 18 de Fevereiro de 2016.

Walker, R.; Larsen, J. C. (2005) Ochratoxin A: Previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 1; pp. 6-9.